

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12Q 1/68	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/11253 (43) Date de publication internationale: 19 mars 1998 (19.03.98)
--	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE97/00102

(22) Date de dépôt international: 9 septembre 1997 (09.09.97)

(30) Données relatives à la priorité:  
9600755 9 septembre 1996 (09.09.96) BE  
9700244 20 mars 1997 (20.03.97) BE

(71)(72) Déposant et inventeur: REMACLE, José [BE/BE];  
Chemin des Pierres 14, B-5020 Malonne (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ALEXANDRE, Isabelle [BE/BE]; Rue du Centre 3, B-5170 Lesve (BE). ZAMMATTEO, Nathalie [BE/BE]; Rue Pierre Fluche 1, B-4800 Verviers (BE). ERNEST, Isabelle [BE/BE]; Rue Hubert Larock 14, B-4280 Poucet (BE).

(74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Bruxelles (BE).

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

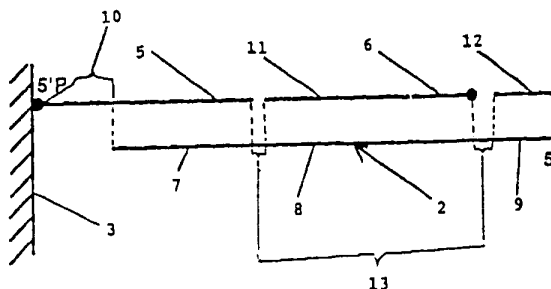
*Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DIAGNOSING AND/OR QUANTIFYING BY SANDWICH HYBRIDISATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES ON SOLID SUPPORT

(54) Titre: PROCEDE ET TROUSSE DE DIAGNOSTIC ET/OU DE QUANTIFICATION PAR HYBRIDATION DE TYPE SANDWICH DE SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES SUR SUPPORT SOLIDE

(57) Abstract

The invention concerns a method for detecting and/or quantifying a target nucleotide sequence (2) present in a biological sample characterised in that it comprises a "sandwich" type contacting of the target nucleotide sequence (2) with a trapper single strand nucleotide sequence (5) fixed on an insoluble solid support (3) and complementary of part (7) of said target nucleotide sequence (2) and with one or several nucleotide sequences (6, 11) of which at least one is marked (6), the said nucleotide sequence(s) (6, 11) being complementary of another part (8) of the target nucleotide sequence (2); in that the trapper nucleotide sequence (5) is fixed covalently by one of its ends on the solid support (3), and has a length between 50 and 500 bases; and in that the part (10) of the trapper nucleotide sequence (5) which is not hybridised with the part (7) of the target nucleotide sequence (2) has less than 60 bases. The invention also concerns the kit for detecting and/or quantifying for implementing this method and the use of one standard quantifying nucleotide sequence.



(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de détection et/ou de quantification d'une séquence nucléotidique cible (2) présente dans un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de type "sandwich" de la séquence nucléotidique cible (2) avec une séquence nucléotidique monobrin trappeur (5) fixée sur un support solide insoluble (3) et complémentaire d'une partie (7) de ladite séquence nucléotidique cible (2) et avec une ou plusieurs séquences (6, 11) nucléotidiques dont au moins une est marquée (6), la ou lesdites séquences nucléotidiques (6, 11) étant complémentaires d'une autre partie (8) de la séquence nucléotidique cible (2); en ce que la séquence nucléotidique trappeur (5) est fixée de manière covalente par l'une de ses extrémités sur le support solide (3), comporte une longueur comprise entre 50 et 500 bases; et en ce que la partie (10) de la séquence nucléotidique trappeur (5) qui ne s'hybride pas avec la partie (7) de la séquence nucléotidique cible (2) est inférieure à 60 bases. La présente invention concerne également la trousse de détection et/ou de quantification pour la mise en oeuvre de ce procédé et l'utilisation d'une séquence nucléotidique standard de quantification.

# *UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

5

PROCEDE ET TROUSSE DE DIAGNOSTIC ET/OU DE QUANTIFICATION  
PAR HYBRIDATION DE TYPE SANDWICH DE SEQUENCES D'ACIDES  
10 NUCLEIQUES SUR SUPPORT SOLIDE

Objet de l'invention

La présente invention concerne un procédé et une trousse comprenant des réactifs pour la détection et/ou  
15 la quantification par hybridation de type sandwich de séquences d'acides nucléiques sur un support solide.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

Il est connu de fixer de l'ADN de manière  
20 covalente sur un support et de l'utiliser comme séquence nucléotidique capteur pour fixer une séquence nucléotidique cible ou standard (destinée à la quantification de la séquence cible) et pouvoir la détecter directement, si elle est fixée à une molécule chimique détectable. Dans le cas  
25 où la séquence nucléotidique cible ou standard à identifier n'est pas marquée, on peut réaliser une hybridation de type "sandwich" en utilisant une séquence nucléotidique marquée.

La séquence nucléotidique marquée sera immobilisée si la séquence nucléotidique cible ou standard  
30 est présente et immobilisée sur une séquence nucléotidique trappeur. La séquence nucléotidique cible ou standard est alors prise en sandwich entre la séquence nucléotidique

trappeur et la séquence nucléotidique marquée, par une double reconnaissance, ce qui augmente la spécificité, réduit le bruit de fond, et permet une quantification des séquences nucléotidiques. Cela n'est possible que si  
5 l'hybridation est réalisée de manière quantitative et reproductible. Ceci est d'autant plus vrai que le rendement de cette hybridation est grand.

L'intérêt d'une telle hybridation quantitative est la mesure d'acides nucléiques provenant  
10 "d'agents biologiques" pathogènes ou non comme les virus, champignons, bactéries, mycoplasmes, cellules ou tissus animaux et végétaux, souvent amplifiés par une étape d'amplification, telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction (US Patent 4965188), la LCR (Landegren et al.,  
15 1988, Science, 241, 1077-1080), le NASBA (Kievits et al. 1991, J. Virol. Methods 35. 273-286), la CPR (Cycling Probe Reaction (WO Patent 95/14106) ou l'ICR.

Cependant, la détection des séquences amplifiées (appelées ci-après amplicons) nécessite de  
20 réaliser une détection spécifique sensible et facilement adaptée à un grand nombre d'échantillons.

Une première solution consiste à utiliser des billes, tel que décrit dans la demande de brevet EP-0205532, où des billes de Sephacryl de 5 à 50  $\mu\text{m}$  sont  
25 activées par diazotation d'amines aromatiques. D'autre part, les plaques multipuits servent déjà de base pour beaucoup de tests, notamment les ELISA et de nombreux appareils de lecture en photométrie, fluorescence, luminescence existent déjà pour la lecture de ces plaques.  
30 Cependant, il faut pouvoir immobiliser les séquences nucléotidiques cibles ou standards sur ces plaques afin de pouvoir les détecter et/ou les quantifier.

Cette fixation peut s'obtenir par simple adsorption (réaction non covalente), et permet de mesurer des amplicons présents en solution (Dahlem et al. 1987, Mol. Cell. Probes 1. 159-168; Cross et al. 1992, The Lancet 5 340. 870-873; Allibert et al., EP 486661). Cependant ces méthodes souffrent d'une absence de contrôle du processus d'adsorption (qui nécessite de travailler avec de très grands fragments, souvent des plasmides entiers, et entraîne l'utilisation de trappeurs doubles brins qui 10 peuvent se réassocier) et de la difficulté d'optimiser la taille et la séquence nucléotidique du fait des aléas liés à l'adsorption.

Dans différents documents de l'état de la technique, on a cherché à optimiser la longueur d'une 15 séquence simple brin pouvant servir de trappeur pour une séquence cible et caractériser la longueur de la séquence cible nécessaire pour être détectée dans les meilleures conditions.

Dans le document "J. of Clin. Microbiol" 20 (Vol. 28, juin 1990, pp. 1469-1472), Inouye et Hondo et al. décrivent un procédé d'hybridation directe sur des séquences fixées sur des microplaques de segments d'ADN de différentes longueurs. Cette hybridation s'effectue sur des segments trappeurs d'ADN adsorbés de manière non covalente 25 sur ces microplaques. Des trappeurs de longueurs différentes sont adsorbés et hybridés avec une séquence biotinylée de 642 paires de base. On observe avec les différentes séquences la même courbe d'hybridation, mais une efficacité d'hybridation croissante en fonction de la 30 taille des fragments. Sur base de cette expérimentation, les auteurs ont conclu qu'il est préférable que la séquence cible à identifier présente une longueur de plus de 300

5 paires de base. Comme l'adsorption de l'ADN sur le plastique se fait sur de très grandes longueurs et se fait en plusieurs endroits, ceci rend impossible la connaissance des longueurs disponibles pour obtenir une hybridation efficace.

Dans le document "Analytical Biochem." (No. 177, pp. 27-32 (1989)), Kellér et al. décrivent un procédé d'hybridation de type sandwich utilisant comme séquence 10 trappeur un fragment de 3300 paires de base servant à la détection d'une séquence cible de 190 paires de base qui est également complémentaire d'une autre séquence marquée, la séquence trappeur simple brin étant fixée par une fonction  $\text{NH}_2$  de manière covalente à un support solide. Comme il apparaît à la figure 2 de ce document, il n'existe 15 qu'un recouvrement très partiel de la séquence trappeur et de la séquence marquée par la séquence cible.

Dans la publication "Clin. Chem." (No. 31, pp. 1438-1443 (1985)), Polsky-Cinky et al. décrivent un procédé dans lequel la séquence trappeur comporte 4800 20 paires de base dont 800 paires de base sont complémentaires de la séquence cible de 1600 paires de base à détecter. Comme il apparaît dans la figure 1 de ce document, la séquence cible est complémentaire dans l'hybridation d'une autre séquence nucléotidique marquée.

25 La demande de brevet japonais JP-8089300 décrit une séquence trappeur présentant une longueur inférieure à 30000 paires de base et comportant au moins 10 unité répétitives de 100 paires de base susceptibles de s'hybrider en série selon la même orientation avec des 30 séquences cibles à détecter et augmente la sensibilité des méthodes traditionnelles.

La demande de brevet EP-0079139 décrit une séquence trappeur simple brin de 1200 à 1500 paires de base s'hybridant avec des séquences cibles de 600 à 700 paires de base, détectées par une hybridation sandwich au moyen d'une séquence marquée et complémentaire d'une autre portion de la séquence cible.

Cependant, dans tous ces dispositifs d'hybridation basés sur une hybridation simple ou une hybridation sandwich, on observe un mauvais recouvrement de la séquence trappeur par la séquence cible, ainsi qu'un mauvais recouvrement de la séquence cible par la séquence trappeur et/ou la séquence marquée. Par conséquent, en utilisant de très longues séquences trappeurs pour la détection ou de très longues séquences cibles à détecter, on observe des reploiements des séquences sur elles-mêmes ou avec d'autres séquences "parasites" présentes dans l'échantillon (séquences complémentaires d'une séquence amplicon, etc.).

Dans le document "Nucleic Acid Research" (Vol. 21, No. 15, pp. 3469-3472 (1993)), Kosaka et al. décrivent des séquences trappeurs fixées par une liaison covalente sur des microplaques. Ces séquences trappeurs très courtes (de l'ordre de 17 paires de base) sont utilisées pour obtenir une hybridation de séquences cibles à identifier et à quantifier en présence de séquences similaires marquées. Comme il apparaît dans la figure 2 de ce document, malgré la faible longueur de la séquence trappeur, il n'existe pas de recouvrement optimal de cette séquence trappeur par la séquence cible à quantifier.

Dans le document "Clin. Chem." (No. 40/2, pp. 200-205 (1994)), Rasmussen et al. décrivent une séquence trappeur simple brin fixée par une liaison

covalente à des microplaques. Cette séquence trappeur très courte (25 nucléotides) est utilisée pour obtenir l'hybridation de séquences cibles de 350 à 500 paires de base.

5 Dans la demande de brevet WO94/06933, on décrit un procédé d'hybridation sandwich au moyen d'une séquence trappeur fixée sur microplaques par hybridation sandwich d'une séquence cible s'hybridant avec une séquence marquée. Cependant, dans les exemples d'exécution, les  
10 séquences trappeurs sont d'une vingtaine de nucléotides utilisées pour l'hybridation de séquences cibles de 400 à 600 paires de base. Lorsque la séquence nucléotidique trappeur est très courte, on observe un mauvais recouvrement de la séquence cible et un reploiement de la  
15 séquence cible sur elle-même ou une réhybridation de séquences cibles entre elles. De plus, le faible pourcentage d'hybridation de la séquence cible sur la séquence trappeur diminue la sensibilité.

Dans le document "Journ. of Clin. Microbiol."  
20 (Vol. 33, pp. 752-754 (1995)), Shaw et al. décrivent un procédé utilisant une séquence trappeur simple brin de 188 paires de base adsorbée sur des microplaques, cette séquence trappeur biotinylée permettant d'hybrider une séquence biotinylée cible de 245 paires de base. Cette  
25 technique d'hybridation non basée sur la reconnaissance de type sandwich présente un mauvais recouvrement de la séquence trappeur par la séquence cible, et dans tous les cas, un mauvais recouvrement de la séquence cible sur au moins une soixantaine de paires de base. Par conséquent,  
30 cette portion de 60 paires de base suffit pour obtenir des reploiements de la séquence cible, voire de la séquence trappeur, sur elle-même, dont les structures secondaires



sont susceptibles de perturber l'hybridation entre la séquence trappeur et la séquence cible, ce qui diminue la sensibilité du test.

Dans le document "Journ. of Chem. Microbiol." (Vol. 9, pp. 638-641 (1991)), Keller et al. décrivent une séquence trappeur simple brin fixée (de manière aléatoire par l'usage de diamino hexane) par une liaison covalente sur des microplaques, cette séquence trappeur simple brin présentant une longueur de 126 paires de base, dont au moins une portion est susceptible de s'hybrider avec une séquence cible de 191 paires de base. Le document mentionne que la séquence simple brin n'est complémentaire que d'une partie de la séquence cible de 191 paires de base, mais n'est pas susceptible d'obtenir un recouvrement complet, en particulier des séquences primers de part et d'autre de cette séquence cible de manière à éviter toute homologie de recouvrement entre les primers et la séquence simple brin. On observe donc aux deux extrémités de la séquence cible plus de 30 paires de base qui ne sont pas recouvertes par la séquence trappeur, la reconnaissance de l'hybridation étant détectée par le marquage de la séquence cible par de la biotine fixée et peut être reconnue par le conjugué streptavidine peroxydase permettant sa détection par colorimétrie. On obtient un mauvais recouvrement de la séquence cible à quantifier et un reploiement de la séquence cible et de l'extrémité de la séquence trappeur fixée sur le support solide. De plus, la fixation du trappeur au puits se fait de manière aléatoire et la portion de la séquence du trappeur accessible à la séquence cible n'est pas connue.

La demande de brevet EP-0205532 décrit une séquence trappeur de 341 paires de base fixée de manière

covalente sur des microbilles, cette séquence trappeur étant susceptible de réagir avec une séquence cible pour obtenir un recouvrement de la séquence trappeur sur la séquence cible de 175 paires de base, la séquence cible réagissant avec une séquence marquée de 201 paires de base par hybridation sandwich. Cependant, ce document ne décrit pas un recouvrement optimal de la séquence trappeur simple brin par la séquence cible. On observe, au niveau de la séquence trappeur simple brin, une portion libre de 166 paires de base au niveau de laquelle des reploiements de la séquence trappeur simple brin sur elle-même ou l'appariement avec d'autres séquences présentes dans l'échantillon sont susceptibles de diminuer le pourcentage de séquence cible s'hybridant sur la séquence trappeur, et la sensibilité de la détection et/ou de la quantification.

Les méthodes d'amplification génétique (PCR, LCR, NASBA) à des fins de diagnostic et de dosage d'acides nucléiques présentent également des problèmes au niveau d'une quantification optimale desdits acides nucléiques. En effet, dans une étape de quantification, il faut réaliser une détection et une quantification dans chacune des 3 étapes du dosage à savoir :

- 1) l'extraction quantitative (souvent complexe) de l'acide nucléique de l'échantillon biologique;
- 2) l'amplification quantitative de la séquence étudiée; et
- 3) la mesure quantitative du nombre de séquences amplifiées (appelées amplicons).

Ces méthodes d'extraction se sont améliorées ces dernières années et le rendement de ces extractions est très souvent supérieur à 90 %, et permet de considérer cette étape comme non limitante dans l'ensemble du processus de quantification de l'acide nucléique.

L'étape d'amplification, notamment par la Polymerase Chain Reaction (PCR) (brevet US-4965188), pose de grosses difficultés pour ce qui est du contrôle de la quantification et de la détection.

5 Dans l'amplification, la première étape consiste à désapparier les doubles brins d'ADN, souvent de très grande longueur (et éventuellement stabilisés par des protéines ou molécules diverses), et à faire monter la température pour que les deux brins soient séparés.

10 La deuxième étape est l'appariement (annealing) des oligonucléotides amorces. Ceux-ci sont en très large excès par rapport à l'ADN à amplifier et l'on peut trouver des conditions dans lesquelles cette reconnaissance est optimale. Ensuite vient l'élongation de  
15 l'ADN à partir des amorces par l'ADN polymérase, qui doit se faire dans des conditions optimales (pH, température, sels, dNTP, ...) pour rencontrer les sites de fixation Amorces-ADN. Même dans les conditions optimales, on constate que le rendement (ou taux) d'amplification, c'est-  
20 à-dire la proportion moyenne des molécules qui se dupliquent au cours d'un cycle ne dépasse pas 90% et peut être même très inférieure à cette valeur (J. Peccoud, 1993, Med/sci, 9, 1379).

De plus, on trouve une variabilité d'un  
25 échantillon à l'autre, d'un même échantillon en fonction de la dilution et même d'un tube à l'autre pour un même échantillon (J. Peccoud, 1993, Med/sci, 12, 1378-1385).

La méthode d'amplification par Ligase Chain  
Reaction (LCR) (Landegren et al., 1988, Science, 241, 1077-  
30 1080) et par NASBA présentent les mêmes difficultés de l'estimation du taux d'amplification et donc de la quantification des séquences cibles à mesurer.

Il existe plusieurs moyens d'obtenir une quantification de la séquence nucléotidique cible. Comme l'amplification dépend de très nombreux facteurs et que des variations sont observées, on doit utiliser comme référence  
5 un standard qui soit le plus proche possible de la séquence cible et si possible qui est amplifié dans le même tube. Un standard interne (c'est-à-dire placé dans le même tube de PCR et amplifié en même temps que la séquence cible) est préféré à la comparaison avec un standard externe qui  
10 serait amplifié parallèlement au test. L'utilisation d'un standard externe n'est possible que dans le cas où la méthodologie d'amplification est standardisée et reproductible.

Il existe cependant une contrainte qui est  
15 celle de la détection quantitative et distincte des 2 amplicons. Pour que l'efficacité de l'amplification soit la même, il faut que les 2 séquences soient les plus semblables possible, tout en gardant la possibilité de pouvoir les différencier lors de leur mesure. De plus, si  
20 pendant toute une série de cycles, l'efficacité est maintenue constante, on constate en fin d'amplification un ralentissement de cette efficacité qui finit par devenir nulle. On obtient un effet plateau pour lequel le nombre d'amplicons n'augmente plus avec le nombre de cycles. Ce  
25 ralentissement apparaît à des endroits différents de la PCR en fonction du nombre de copies présentes au départ. Ceci complique l'utilisation du standard interne qui continue à être amplifié lorsque la cible est déjà arrivée au plateau. Si la différence de concentration entre les 2 séquences est  
30 trop grande, l'une des 2 arrivera au plateau alors que l'autre ne sera pas encore en concentrations suffisantes pour être mesurée. Ces contraintes conduisent souvent les

auteurs à se limiter à des concentrations en standard interne très proches de celles des séquences cibles et à travailler dans la zone d'amplification logarithmique de la PCR, c'est-à-dire avec un nombre d'amplicons réduit.

5                   La demande de brevet WO96/09407 décrit un procédé d'amplification comprenant l'utilisation d'un standard interne présentant une partie spécifique différente de la séquence nucléotidique cible à quantifier par 17 acides animés. Dans ce cas, les séquence cible et  
10 standard de même longueur sont quantifiées en les fixant à des biotines réagissant sur une streptavidine fixée sur un support solide.

                  La demande de brevet WO93/10257 décrit un procédé de quantification d'un fragment d'ADN par  
15 l'addition d'un standard interne différent du fragment d'ADN cible à quantifier par moins de 10% en séquence et/ou en taille. La séquence nucléotidique standard diffère du fragment d'ADN cible par une séquence spécifique comportant une délétion, mutation ou addition en un site de 1 à 5  
20 nucléotides permettant l'incorporation d'un site de restriction ou de coupure réalisable par une enzyme ou tout autre moyen. La quantification s'effectue par une reconnaissance spécifique du fragment d'ADN cible ou de la séquence nucléotidique standard par des amorces spécifiques  
25 différentes. L'utilisation d'amorces différentes s'hybridant avec les fragments dans des sites différents va générer des fragments marqués de tailles et de séquences différentes, qui pourront être séparés par électrophorèse. Ce procédé est basé sur une double vérification de la  
30 spécificité d'identification. Cependant, de tels procédés et dispositifs basés sur l'identification sélective de la séquence standard en une étape, ne garantissent pas une

spécificité et une sensibilité suffisantes, ce qui peut occasionner la présence de faux positifs ou de faux négatifs lors d'une quantification d'une séquence nucléotidique cible.

5

#### Buts de l'invention

La présente invention vise à fournir un nouveau procédé et une trousse permettant une détection et/ou une quantification de séquence d'acides nucléiques  
10 qui ne présenteraient pas les inconvénients de l'état de la technique cité.

Un but particulier de la présente invention vise à fournir un procédé et une trousse permettant une hybridation optimale des séquences d'acides nucléiques, en  
15 particulier un haut pourcentage d'hybridation de la séquence trappeur par une séquence cible ou standard, un faible risque de reploiment de ces séquences ou de la séquence trappeur sur elle-même et un faible risque de ré-appariement de ces séquences par des séquences  
20 complémentaires présentes dans l'échantillon.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé et une trousse de détection et/ou de quantification présentant une spécificité et une sensibilité améliorées par rapport aux procédés et aux  
25 dispositifs de l'état de la technique, en particulier pour la détection et/ou la quantification de tout type d'acides nucléiques présents dans un échantillon biologique et obtenus éventuellement après une amplification génétique.

Un but additionnel de la présente invention  
30 vise à obtenir un procédé et une trousse de détection et/ou de quantification de ladite séquence d'acides nucléiques cible qui permettent l'amplification d'une séquence

standard interne ou externe quel que soit le nombre de cycles d'amplification génétique.

Eléments caractéristiques de l'invention

5 La présente invention est relative à un procédé de détection et/ou de quantification d'une séquence nucléotidique dénommée "cible" présente dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend une mise en contact de type "sandwich" de ladite séquence nucléotidique  
10 cible 2 avec une séquence nucléotidique dénommée "trappeur" 5 fixée sur un support solide insoluble 3, ladite séquence nucléotidique trappeur étant complémentaire d'une partie 7 de la séquence nucléotidique cible, la mise en contact de type "sandwich" s'effectuant également avec une ou  
15 plusieurs autre(s) séquence(s) nucléotidique(s) (6, 11) dont au moins une (6) est marquée, la ou lesdites séquence(s) nucléotidique(s) (6,11) (dont au moins une (6) est marquée) étant complémentaire(s) d'une autre partie 8 de la séquence nucléotidique cible 2 (une autre partie que  
20 celle 7 hybridée par la séquence nucléotidique "trappeur" 5); en ce que la séquence nucléotidique trappeur 5 est fixée de manière covalente par une de ses extrémités au support solide 3; en ce que la séquence nucléotidique trappeur 5 comporte une longueur comprise entre 50 et 500  
25 bases, de préférence entre 100 et 300 bases, plus particulièrement entre 120 et 250 bases; et en ce qu'une partie 10 de la séquence nucléotidique trappeur 5 ne s'hybridant pas avec la partie 7 de la séquence nucléotidique cible 2 est inférieure à 60 bases, de  
30 préférence inférieure à 40 bases ou inférieure à 20 bases, voire nulle.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, les parties 13 de la séquence nucléotidique cible 2 ne s'hybridant pas avec la séquence nucléotidique trappeur 5 et avec la ou le(s) séquence(s) nucléotidique(s) (6, 11) (dont au moins une (6) est marquée), est inférieure à 60 bases, de préférence inférieure à 40 bases, voire nulle.

Dans la suite de la description, la ou les séquence(s) nucléotidique(s) (6, 11) (dont au moins une (6) est marquée) prendront la dénomination de séquences nucléotidiques "helper" 11 lorsque la ou lesdites séquences ne sont pas marquées, et de séquences nucléotidiques "marquées" 6 lorsque celles-ci sont susceptibles d'être reconnues directement ou indirectement par un système de détection et/ou de quantification, de préférence choisi parmi le groupe constitué par la fluorescence, la chemoluminescence, l'électroluminescence, la coloration, la détection par marquage radioactif, la bioluminescence, l'électrochimie, la réflexion de la lumière, un procédé optique ou un mélange d'entre eux.

Les séquences nucléotidiques "helper" 11 sont utilisées pour stabiliser le "sandwich" et obtenir un recouvrement le plus complet possible de la séquence nucléotidique cible 2 sur la séquence nucléotidique marquée 6 et sur la séquence nucléotidique trappeur 5, ce qui augmente la sensibilité et la spécificité du procédé selon l'invention.

Dans le procédé de détection et/ou de quantification, l'hybridation sandwich se réalise de préférence en deux étapes, c'est-à-dire que la première étape consiste en l'hybridation de la séquence nucléotidique cible 2 sur la séquence nucléotidique



trappeur 5 et que la seconde étape est l'hybridation de la séquence nucléotidique cible 2 par une ou plusieurs séquences nucléotidiques (6, 11) dont au moins une (6) est marquée. Les deux étapes sont de préférence séparées par  
5 une étape de lavage. Dans le mode d'utilisation préféré, les séquences sont choisies de manière à ce que les conditions (température, concentration en sels, temps de réaction) soient compatibles pour les deux hybridations, ce qui permet de réaliser l'hybridation en une seule étape.

10 Selon l'invention, les séquences nucléotidiques cible et standard à détecter et/ou quantifier sont constituées de tout type d'acide nucléique, ADN ou ARN. De préférence, les séquences nucléotidiques trappeur, "helper", marquée(s) et standard(s) utilisées  
15 selon la présente invention sont constituées d'ADN de manière à éviter toute destruction de ces séquences par des RNase éventuellement présentes dans l'échantillon biologique.

Avantageusement, les séquences nucléotidiques  
20 cible 2 et standard 1 sont le résultat d'une amplification préalable par un procédé d'amplification génétique, de préférence choisi parmi le groupe constitué par la PCR, la LCR, la CPR, la NASBA ou l'ICR.

Selon l'invention, dans le cas où la séquence  
25 nucléotidique cible 2 est un amplicon résultant d'une amplification génétique, la partie 9 terminale 5' de la séquence nucléotidique cible 2 peut être laissée non recouverte par la ou les séquence(s) marquée(s) 6 et la ou les séquence(s) nucléotidique(s) "helper" 11, et est alors  
30 recouverte par une séquence nucléotidique "primer" 12 (dénommée également "amorce") complémentaire, utilisée pour l'amplification de la séquence nucléotidique cible 2. Selon

l'invention, on peut considérer cette séquence nucléotidique "primer" 12 comme étant une séquence de type "helper". Il est donc possible d'obtenir également un recouvrement optimal, voire total, de la séquence 5 nucléotidique cible 2 par la séquence nucléotidique trappeur 5, la ou les séquence(s) nucléotidique(s) 6 marquée(s), et éventuellement la ou les séquences nucléotidiques "helper" 11 et le primer 12.

L'invention concerne également un procédé de 10 quantification d'une séquence nucléotidique cible 2 présente dans un échantillon biologique, qui comprend les étapes suivantes :

- une préparation d'une quantité connue d'une séquence nucléotidique standard 1 possédant au moins une partie A 15 commune à la séquence nucléotidique cible 2 et une partie spécifique B dont la séquence est différente et possède un contenu en bases GC/AT proche, de préférence identique, à la séquence d'une partie spécifique B de la séquence nucléotidique cible 2,
- 20 - une extraction éventuelle de la séquence nucléotidique cible 2 à quantifier de l'échantillon biologique,
- une amplification éventuelle de la séquence nucléotidique cible 2, et
- une mise en contact de type "sandwich" des séquences 25 nucléotidiques cible 2 et standard 1 avec une séquence nucléotidique trappeur 5, de préférence telle que décrite ci-dessus, la séquence nucléotidique trappeur 5 étant complémentaire de la partie commune de la séquence nucléotidique cible et de la séquence nucléotidique standard, la mise en contact de type "sandwich" 30 s'effectuant également avec une ou plusieurs séquences

nucléotidiques (6, 11) dont au moins une (6) est marquée et complémentaire de la partie spécifique B de la séquence nucléotidique cible 2 ou de la partie spécifique B de la séquence nucléotidique standard 1,

- 5 - ledit procédé comprenant également une quantification du rapport entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible 2 et le marquage spécifique de la séquence nucléotidique standard 1.

On entend par "contenu en bases GC/AT proche", que le rapport en bases GC/AT du standard soit  
10 différent de moins de 20% du rapport en bases GC/AT de la séquence nucléotidique cible.

Par conséquent, dans le procédé de quantification selon l'invention, on combine  
15 avantageusement la mise en contact de type "sandwich" telle que décrite précédemment ou non avec un dispositif de quantification par une séquence nucléotidique standard interne ou externe.

Les parties spécifiques B des séquences  
20 nucléotidiques standard et cible correspondent de préférence à la partie 8 des séquences nucléotidiques cible ou standard. La partie commune A correspond de préférence à la partie 7 de cette séquence nucléotidique cible ou standard s'hybridant avec la séquence nucléotidique  
25 trappeur 5.

Selon l'invention, la partie spécifique B de la séquence nucléotidique standard 1 est différente de la partie spécifique B de la séquence nucléotidique cible par 5 à 500 nucléotides, de préférence par 20 à 40 nucléotides.

30 Avantageusement, la séquence nucléotidique standard interne 1 comporte de part et d'autre de la séquence spécifique B et commune A des parties 15 communes

à des parties 15 de la séquence nucléotidique cible 2, et pouvant servir en totalité ou en partie de séquences complémentaires à des séquences amorces 12 pour une amplification génétique.

5 Le procédé selon l'invention est particulièrement adapté pour l'utilisation de séquences nucléotidiques standards internes amplifiées conjointement avec la séquence nucléotidique cible 2 ou de standards externes amplifiés en parallèle avec les séquences  
10 nucléotidiques cible 2.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comporte un nombre élevé de cycles d'amplification génétique, de préférence par PCR ou LCR, de préférence supérieur à 30.

15 Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le standard interne est ajouté en quantité variable à l'échantillon de départ et le rapport obtenu entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible 2 et le marquage spécifique de la séquence  
20 nucléotidique standard 1 est porté en graphique en fonction de quantités connues ajoutées à l'échantillon de départ, permettant de déterminer sur la droite ainsi obtenue, pour un rapport égal à 1, quelle est la quantité de séquence nucléotidique cible 2 présente dans l'échantillon.

25 Selon une autre forme d'exécution préférée de la présente invention, la séquence nucléotidique standard est ajoutée en quantité identique à un échantillon ayant subi diverses dilutions, et le rapport entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible et le  
30 marquage spécifique de la séquence nucléotidique standard est porté en graphique en fonction des dilutions de l'échantillon, et la droite obtenue permet de déterminer,

pour un rapport égal à 1, quelle est la quantité de séquence nucléotidique cible 2 présente dans l'échantillon. La quantification peut également être réalisée par comparaison du rapport obtenu avec une seule quantité 5 déterminée de standard ajouté à une seule quantité d'échantillon et d'une droite d'étalonnage.

La présente invention concerne également la trousse de détection et/ou de quantification comprenant les réactifs pour la réalisation des procédés décrits ci-  
10 dessus.

La trousse de détection et/ou de quantification par hybridation de type "sandwich" d'une séquence nucléotidique - cible 2 comprend une séquence nucléotidique trappeur 5 fixée sur un support solide 3  
15 insoluble et complémentaire d'une partie 7 de la séquence nucléotidique cible 2 et une ou plusieurs autres séquence(s) nucléotidique(s) (6, 11) (dont au moins une (6) est marquée), la ou lesdites séquence(s) nucléotidique(s) (6, 11) étant complémentaire(s) d'une autre partie 8 de la  
20 séquence nucléotidique cible 2. Dans la trousse de détection et/ou de quantification selon l'invention, ladite séquence nucléotidique trappeur 5 est fixée de manière covalente par l'une de ses extrémités sur le support solide 3 et comporte une longueur comprise entre 50 et 500 bases,  
25 de préférence entre 100 et 300 bases, plus particulièrement entre 120 et 250 bases, et la partie 10 de la séquence nucléotidique trappeur 5 qui ne s'hybride pas avec la partie 7 de la séquence nucléotidique cible 2 est inférieure à 40 bases, de préférence inférieure à 20 bases,  
30 voire nulle.

Il est bien entendu que dans le procédé et la trousse selon l'invention, la séquence nucléotidique

marquée présente une longueur suffisante pour reconnaître de manière spécifique la séquence nucléotidique cible ou standard à détecter et/ou quantifier, cette spécificité dépendant du type de séquence nucléotidique cible ou  
5 standard à détecter et/ou quantifier, et peut être caractérisée par une reconnaissance par hybridation d'une portion spécifique complémentaire d'au moins 10 bases, de préférence de plus de 20 bases, de la séquence nucléotidique cible ou standard.

10 La trousse selon l'invention comprendra également les réactifs nécessaires pour l'identification spécifique de la séquence marquée, pour la détection et/ou la quantification par un procédé choisi de préférence parmi le groupe constitué par la fluorescence, la  
15 chémoluminescence, l'électroluminescence, la coloration, la détection par marquage radioactif, la bioluminescence, l'électrochimie, la réflexion de la lumière, un procédé optique ou un mélange d'entre eux.

La séquence nucléotidique trappeur 5 est  
20 fixée de manière covalente sur le support solide insoluble 3 et se réalise de préférence par l'intermédiaire d'un phosphate 5' terminal de la séquence nucléotidique trappeur 5 sur une ou plusieurs fonctions amines du support solide 3 insoluble par réaction avec du carbodiimide.

25 Le support solide insoluble 3 est choisi de préférence parmi le groupe constitué par des tubes, des filtres, des billes, éventuellement magnétiques, des plaques multipuits, une plaque ou un mélange d'entre eux.

L'invention concerne également une trousse de  
30 détection et/ou de quantification qui comporte une séquence nucléotidique standard 1 interne ou externe telle que décrite ci-dessous et tous les éléments nécessaires pour

l'extraction, l'amplification, la détection et/ou la quantification selon les procédés décrits ci-dessus.

La présente invention sera décrite plus en détails dans les exemples ci-dessous en référence aux 5 figures annexées.

#### Brève description des figures

- La figure 1 représente un exemple schématique d'hybridation sandwich selon l'invention.
- 10 La figure 2 représente une courbe de concentration d'ADN cible de CMV obtenue après hybridation en sandwich et détection en bioluminescence.
- La figure 3 représente une courbe de sensibilité d'ADN de Chlamydia trachomatis mesurée après 15 amplification par PCR, hybridation sandwich et détectée en colorimétrie par le conjugué streptavidine-peroxydase.
- La figure 4 représente un schéma illustrant la structure 20 nucléotidique d'un standard compétitif type, comparé à celle d'un ADN cible à mesurer lors d'une amplification par PCR.
- La figure 5 représente un schéma d'un standard compétitif (A) pour la mesure de l'ADN viral de CMV et sa comparaison avec l'ADN cible (B). La 25 numérotation correspond à la séquence nucléotidique "immediate early gene" (Demmler et al., 1988, J. Infectious Diseases, 158, 1177- 1184).
- La figure 6 représente un schéma d'un standard compétitif (A) pour la mesure de l'ARN du virus HIV et sa comparaison avec l'ARN cible (B). La 30 numérotation correspond à la séquence

nucléotidique de l'ARN viral ("Los Alamos de HIV", Meyers et al. (1992)).

La figure 7 est une description schématique du principe de la quantification d'un ADN cible par utilisation d'un standard compétitif selon l'invention et leur mesure respective par des sondes spécifiques après capture sur une séquence commune immobilisée.

La figure 8 représente une courbe de la concentration en ADN cible de CMV et du standard correspondant par hybridation sandwich et mesuré en spectrophotométrie.

La figure 9 représente une courbe de concentration en ADN cible de CMV et en standard correspondant après amplification par PCR et hybridation sandwich en utilisant une sonde trappeur commune et une sonde biotinylée spécifique de l'ADN cible ou du standard.

La figure 10 représente les mesures de l'ADN cible de CMV et du standard interne après une amplification par 40 cycles de PCR lorsque 1000 copies de standard ont été ajoutées à des quantités croissantes d'ADN cibles et mesurées après PCR par hybridation sandwich comme défini à la figure 7.

La figure 11 représente la droite d'étalonnage d'un ADN cible de CMV par l'utilisation d'un standard interne selon l'invention. L'abscisse représente les rapports des signaux de cible et du standard obtenus à la figure 10.

La figure 12 représente la quantification d'un ADN cible de CMV en fonction du nombre de cycles de la



PCR grâce à l'utilisation d'un standard compétitif selon l'invention. Un standard compétitif de la séquence de CMV tel que décrit à la figure 5 a été utilisé et ajouté en quantité constante à l'échantillon ayant subi 4 dilutions différentes.

La figure 13 représente une RT-PCR compétitive réalisée sur un ARN cible de HIV et un ARN standard (figure 6) et une détection en bioluminescence après hybridation sandwich. Le graphique représente pour chaque RT-PCR le rapport entre la détection obtenue en utilisant une sonde spécifique du cible et celle du standard. Les résultats montrent une compétition entre l'amplification du cible ajouté en quantité constante ( $10^8$  copies) par rapport au standard ajouté en quantité décroissante allant de  $10^{10}$  (1),  $10^8$  (2) à  $10^6$  (3) copies.

#### Description d'une forme d'exécution préférée de l'invention

La séquence nucléotidique trappeur 5, de préférence une séquence d'ADN, est fixée de manière covalente sur des plaques de multipuits 3. Cette fixation covalente est obtenue par la liaison d'un phosphate situé en position 5' terminale de la séquence du trappeur sur une amine située sur le support en présence de carbodiimide, telle que décrite par Rasmussen et al. (1991, Anal. Biochem. 198, 138-142).

Les séquences nucléotidiques trappeur 5 fixées peuvent hybrider un ADN cible 2, qui sera ensuite

hybridé en sandwich par une séquence nucléotidique marquée  
6.

Un avantage de l'hybridation en sandwich est  
un bruit de fond très faible qui permet de réaliser une  
5 analyse massive d'échantillons cliniques avec un minimum de  
purification de l'ADN.

La quantité de séquences nucléotidiques  
trappeurs fixées sur les multipuits peut atteindre 1,2  
pmoles pour des petits oligonucléotides, mais en ce qui  
10 concerne les séquences nucléotidiques plus grandes, la  
quantité fixée est moins importante (de l'ordre de 300  
fmoles pour des séquences nucléotidiques de 500 bases  
environ). La quantité de séquences nucléotidiques trappeurs  
fixées est suffisante pour ne pas être limitante dans le  
15 procédé d'hybridation de l'invention.

La fixation de la séquence nucléotidique  
trappeur sur des microbilles permet également d'augmenter  
le nombre de séquences nucléotidiques trappeurs dans la  
solution de réaction en utilisant une quantité de billes  
20 plus importante.

Les séquences nucléotidiques trappeurs selon  
l'invention choisies sont complémentaires sur toute leur  
longueur de la séquence nucléotidique cible à détecter.  
Ceci permet avantageusement une production aisée de ces  
25 séquences nucléotidiques trappeurs par PCR à partir de  
séquences nucléotidiques cibles clonées dans des plasmides  
et peuvent ainsi servir à une production industrielle  
reproductible de ces séquences nucléotidiques trappeurs.

On peut cependant utiliser des trappeurs dont  
30 une partie de la séquence nucléotidique comprend une ou des  
parties de séquences non complémentaires de la séquence du  
cible. Les Inventeurs ont testé des séquences

nucléotidiques trappeurs possédant une séquence de 20 ou 40 bases non complémentaire de la séquence nucléotidique cible et située en position 5' terminale servant à la fixation sur les multipuits.

5 Ces séquences servent de "spacers" entre la séquence trappeur proprement dite et le support solide. Dans cette expérience, la séquence portant un "spacer" de 20 bases est plus efficace que les spacers de 40 et 60 bases pour hybrider de petites séquences cibles. Ce  
10 résultat est probablement dû aux possibilités supplémentaires de repliement de ces séquences nucléotidiques trappeurs sur elles-mêmes, ce qui diminue, voire inhibe, l'hybridation des séquences nucléotidiques cibles. Ces repliements ont pu être visualisés par  
15 l'utilisation des programmes de prédiction des structures secondaires Oligo4 et DNA-fold et ils peuvent effectivement impliquer des portions parfois assez longues de la séquence trappeur.

Ces repliements sont à éviter au maximum, car  
20 ils diminuent l'efficacité de l'hybridation, surtout lorsqu'ils impliquent des portions non complémentaires à la séquence cible qui ne peut donc pas les déplacer.

Une autre propriété du procédé et de la trousse de l'invention est l'utilisation avantageuse de  
25 séquences nucléotidiques trappeur ayant une taille minimale de 50 bases si possible 100 et au mieux 150 ou plus de bases. Cette observation est inattendue sur la base de considérations suivantes.

La stabilité des hybrides, dans le cas où la  
30 force ionique est constante et la taille suffisante (au delà de 50 bases), ne dépend plus que de la composition (% G + C) et non de la taille des hybrides. L'importance de

la taille pour favoriser ou non l'hybridation dépend de la vitesse de l'hybridation et non de leur stabilité. Effectivement, en solution, la taille des brins d'acides nucléiques influence la vitesse de réappariement. Celle-ci  
5 est proportionnelle à la racine carrée de la longueur (Wetmur, J.G. and Davidson, N. 1968, J. Mol. Biol. 3, 584) et dans le cas où les 2 brins sont de taille différente, la vitesse est proportionnelle à la racine carrée du brin le plus court que ce soit un ADN (Wetmur, J.G. 1971,  
10 Biopolymers 10, 601) ou un ARN (Hutton, J.R. and Wetmur, J.G. 1973, J. Mol. Biol. 77, 495).

L'autre facteur qui influence la vitesse de l'hybridation est la concentration respective des séquences nucléotidiques cibles et des séquences nucléotidiques  
15 trappeurs. La situation dans ce cas est complexe car deux réactions sont possibles : d'une part les séquences nucléotidiques cibles à mesurer étant habituellement double brins dans la solution de départ, elles vont pouvoir se réassocier entre elles et d'autre part elles vont pouvoir  
20 s'hybrider sur la séquence nucléotidique trappeur. Il s'agit donc de deux réactions compétitives, l'une se passant en solution (la réassociation des doubles brins de la séquence nucléotidique cible) et l'autre sur un support solide (l'hybridation sur la séquence nucléotidique  
25 trappeur).

On peut considérer tout d'abord la situation où la quantité de séquence nucléotidique trappeur est en excès par rapport à la quantité de séquence nucléotidique cible. On détecte des concentrations de séquence  
30 nucléotidique cible de l'ordre de la fmole (de 0,1 à 50 fmoles) alors que la quantité de séquence nucléotidique trappeur peut atteindre 300 fmoles.

Si les 2 réactions compétitives se passaient en solution, la formule cinétique qui exprime la diminution de la concentration en séquence nucléotidique cible simple brin (ADN) en solution (Cs) en fonction du temps est de :

$$5 \quad -\frac{d(Cs)}{dt} = k_1[Cf][Cs] + k_2[Cs]^2$$

dans laquelle :

$k_2$  : constante cinétique de réassociation de l'ADN

$k_1$  : constante cinétique d'hybridation avec la séquence nucléotidique

10 Cf : concentration de la séquence nucléotidique qui s'hybride sur l'ADN.

Comme la réaction s'effectue sur support solide insoluble, il faut tenir compte de la vitesse de diffusion (J) de la séquence nucléotidique cible simple brin vers la surface solide sur laquelle est fixée la séquence nucléotidique trappeur, soit :

$$15 \quad -\frac{d(Cs)}{dt} = J + k_1[Cf][Cs] + k_2[Cs]^2$$

La situation devient très complexe et ne peut être appréhendée dans son ensemble. Anderson et Young (1985) ont essayé de mesurer l'influence de la taille de la séquence nucléotidique cible double brin sur l'hybridation sur filtre en présence d'un excès de séquence nucléotidique fixée et ils concluent "The difference in dependence on molecular weight of the two types of filter hybridization is not understood".

En ce qui concerne l'influence de la taille de la séquence nucléotidique trappeur sur support solide en plastique, les études n'ont pas encore été réalisées et il n'est pas possible d'obtenir une formulation mathématique

permettant de prévoir les résultats obtenus avec le procédé de l'invention.

Si on examine cependant les conditions particulières du milieu réactionnel, on constate que la  
5 quantité de séquence nucléotidique trappeur (par exemple 300 fmoles) est largement en excès par rapport à la quantité de séquence nucléotidique cible (par exemple 10 fmoles). Si on considère que cet excès permet de compenser les limitations dues à la diffusion, on se retrouve dans  
10 une situation proche de la réaction en solution où la vitesse d'hybridation devrait être proportionnelle à la racine carrée de la longueur des séquences.

En choisissant une séquence nucléotidique trappeur de 360 bases au lieu de 180 bases, on a observé le  
15 déplacement d'un rendement de 30% à 50% soit une augmentation de 1,67 fois. Même en se basant sur un effet de taille en solution c'est-à-dire à une vitesse dépendant de la racine carrée de la longueur, on aurait dû s'attendre à une augmentation maximale de 1,4 fois. En outre, un  
20 rendement de 50% n'a jamais été décrit à ce jour dans la littérature scientifique.

En comparant les rendements de l'hybridation en fonction de petites séquences nucléotidiques trappeurs allant de 50, 100, 150 et 250 bases, on constate (en  
25 prenant l'hybridation sur la séquence nucléotidique trappeur de 50 bases comme référence), une augmentation de rendement de 4, 6 et 17 fois alors que les racines carrées de ces séquences sont dans un rapport respectif de 1,4, 1,7 et 2,2 fois.

30 On constate donc un effet inattendu de la longueur de ces séquences nucléotidiques trappeurs sur l'augmentation du rendement de l'hybridation.

Une application particulière de ces hauts rendements d'hybridation de l'ADN cible sur support insoluble est son utilisation pour purifier un des deux brins de cet ADN cible. En effet le trappeur est constitué  
5 d'un seul brin car on utilise lors de sa construction par PCR une seule amorce phosphorylée en position 5' terminale. Ce phosphate est le seul à pouvoir réagir sur le support aminé. Après fixation, on lave la plaque en présence de NaOH 0,4 N (cfr. exemple 1) afin d'enlever le deuxième  
10 brin. On se retrouve donc avec un seul brin fixé sur le support. Ce brin étant complémentaire d'un seul des deux brins d'ADN cible, il va fixer ce brin. Après lavage, ce brin hybridé peut être déhybridé facilement par exemple par chauffage ou par du NaOH 0,4 N. On obtient ainsi dans la  
15 solution un brin unique d'ADN. Cette technique peut être utilisée sur une grande échelle par exemple en utilisant des billes sur lesquelles sont fixées les séquences nucléotidiques trappeurs. Cette préparation de brin simple peut avoir de multiples applications comme réactifs en  
20 utilisant un brin marqué chimiquement par exemple.

La détection de séquences cibles non marquées est réalisée en utilisant leur hybridation sur des séquences nucléotidiques trappeurs fixées sur un support insoluble en utilisant une ou plusieurs séquences  
25 nucléotidiques dont au moins une est marquée (séquences nucléotidiques de détection) qui peuvent s'hybrider sur la partie de la séquence nucléotidique cible non reconnue par la séquence nucléotidique trappeur. Cette séquence peut être marquée chimiquement et détectée suivant les diverses  
30 méthodes connues de l'homme de l'art. Il est possible d'obtenir une fixation de 80% au moins de la séquence nucléotidique de détection par rapport à la séquence

nucléotidique cible hybridée sur la séquence nucléotidique trappeur.

En examinant l'influence de la longueur de cette séquence nucléotidique marquée sur l'efficacité de l'hybridation sandwich, on constate l'importance d'utiliser une séquence nucléotidique marquée qui recouvre le plus possible la séquence nucléotidique cible. Les meilleurs rendements sont obtenus lorsque la séquence nucléotidique cible est recouverte entièrement d'une part par la séquence nucléotidique trappeur et d'autre part par la séquence nucléotidique de détection (figure 1).

Dans le cas de la détection d'amplicons obtenus par PCR, on peut laisser du côté 5' terminal de la séquence nucléotidique cible une séquence non recouverte par la séquence nucléotidique de détection mais qui pourra être reconnue par les amorces toujours présentes dans la solution de la PCR. De cette manière l'ensemble de la séquence nucléotidique cible est recouvert lors de l'hybridation et il n'y a pas d'interférence entre les amorces et la séquence nucléotidique pendant l'hybridation.

L'efficacité accrue obtenue par cette procédure peut probablement s'expliquer de la manière suivante. Lorsque l'on réalise l'hybridation en une seule étape, la séquence nucléotidique cible dissociée en simple brin se retrouve dans la solution en présence de son brin de séquence nucléotidique cible complémentaire mais aussi de la séquence nucléotidique de détection (et éventuellement des amorces) et sur le support de la séquence nucléotidique trappeur. La séquence nucléotidique cible peut soit d'abord réagir avec la séquence nucléotidique de détection avant de venir se fixer sur le trappeur, soit se fixer sur le trappeur avant de fixer la



séquence nucléotidique de détection. Dans les 2 cas, l'utilisation de grandes séquences nucléotidiques va favoriser la vitesse de réaction ainsi que la stabilité des hybrides formés. Cependant dans cet état intermédiaire, où  
5 seule la séquence nucléotidique est hybridée, la séquence nucléotidique cible possède une partie de sa séquence non appariée qui peut alors être reconnue par une séquence nucléotidique cible complémentaire qui pourra redéplacer l'hybride intermédiaire et refaire une séquence  
10 nucléotidique cible double brin. Par contre lorsque la séquence nucléotidique cible sera hybridée et recouverte complètement par la séquence nucléotidique trappeur et par la séquence nucléotidique de détection sans avoir aucun (ou trop peu) de séquence libre, l'appariement (annealing) d'un  
15 autre brin de la séquence nucléotidique cible complémentaire ne pourra plus avoir lieu et l'hybride sandwich sera stable. Dans le cas où la séquence nucléotidique cible même après hybridation sandwich garde une séquence libre, celle-ci pourra toujours servir de site  
20 d'appariement pour l'autre brin de la séquence nucléotidique cible complémentaire, ce qui déstabilisera l'hybride et pourra même le dissocier en fonction des conditions expérimentales (température, sels, ...), car une fois l'appariement commencé, la propagation de la formation  
25 du double brin est très rapide et thermodynamiquement favorable.

Cette optimisation des divers paramètres et composés intervenant dans cette hybridation sandwich permet de réaliser cette hybridation sandwich à la fois avec une  
30 séquence nucléotidique marquée présente dans la solution et une séquence nucléotidique trappeur fixée sur un support insoluble en même temps alors que si ce n'est pas le cas,

il faut d'abord réaliser une hybridation en solution avant de faire la capture sur une séquence nucléotidique immobilisée comme décrit par Ghost et al. (EP. 557456) ou par un système plus complexe d'hybridation sandwich en solution puis capture par un récepteur fixé sur un support solide (Miller, US : 5,374,524).

Une autre caractéristique du procédé d'hybridation sandwich selon l'invention est que non seulement la séquence cible peut être entièrement recouverte par la séquence nucléotidique trappeur et la séquence nucléotidique marquée, mais que la séquence trappeur peut être entièrement recouverte par la séquence cible. Ceci permet donc d'utiliser comme séquence nucléotidique marquée des grandes séquences nucléotidiques doubles brins produites par exemple facilement par une amplification en PCR en présence de dUTP-biotine. En effet une fois l'un de ces brins biotinylés appariés avec la séquence nucléotidique cible, il sera totalement recouvert et ne pourra plus être redéplacé par son brin complémentaire, ce qui n'est pas le cas dans ces travaux rapportés par Keller et al. (1989, Anal. Bioch. 177, 27-32). Cette invention permet donc une production facile en très grande quantité d'une part des séquences nucléotidiques trappeur en utilisant une amorce portant un phosphate en 5' terminal qui permettra la fixation covalente d'un seul de ces brins sur les microplaques aminées et d'autre part des séquences nucléotidiques marquées. Si les séquences marquées sont petites, de 20-30 ou 40 bases, elles seront synthétisées chimiquement et seront simples brins. Si elles sont plus grandes, on peut les produire par amplification.

Le dépassement de la séquence nucléotidique cible en dehors de la partie hybridée sur le capteur et la séquence nucléotidique de détection par son extrémité 5' terminale entraînait une diminution du rendement d'hybridation si cette partie non recouverte devenait importante. C'est aussi le cas si la partie 3' terminale n'est pas recouverte. En choisissant des conditions de réaction optimales, une séquence nucléotidique cible de 20 bases se fixe sur une séquence nucléotidique trappeur de 20 bases qui lui est complémentaire avec un rendement qui peut être 25 fois supérieur par rapport à une séquence qui possède les mêmes 20 nucléotides mais qui a en outre 20 autres nucléotides supplémentaires du côté 3' terminal. On voit donc une différence d'efficacité de 25 fois entre ces 2 séquences du fait de la présence d'un morceau de la séquence non hybridée du côté 3'. L'explication d'un tel effet est sans doute due à un effet d'encombrement stérique de cette séquence libre située près du support. Cet effet inattendu peut être utilisé afin de pouvoir mesurer des petites séquences de nucléotides en présence de séquences plus grandes c'est le cas dans des méthodes d'amplifications comme la CPR où le produit de la réaction à mesurer est une petite séquence provenant d'une séquence nucléotidique de départ plus grande.

L'invention concerne la construction d'une ou de plusieurs séquences d'oligonucléotides (ADN ou ARN) ayant des spécificités particulières, telles que décrites ci-dessous, et leur utilisation comme standards pour la mesure de séquence(s) cible(s) d'ADN ou d'ARN par hybridation sandwich à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées selon le procédé décrit ci-dessus ou non.

La construction représentée à la figure 4 de cette séquence "standard" 1 a été conçue de manière à ce que, en cas d'une éventuelle amplification préalable, l'efficacité de l'amplification soit identique ou très  
5 proche de celle de la séquence cible 2 à quantifier et que les amplicons du standard et du cible puissent être quantifiés avec une efficacité égale ou très proche.

Le standard 1 selon l'invention est compatible avec une éventuelle amplification préalable et  
10 une détection quantitative d'une séquence d'ADN (ou ARN) dont une partie A de la séquence est identique à l'ADN cible et une partie B, au moins (la plus petite possible) est différente. Dans le cas d'une amplification par PCR, ces deux parties seront flanquées de deux séquences 3  
15 identiques à celles de l'ADN ou l'ARN cible qui serviront de matrice pour la fixation d'oligonucléotides amorces (primers) 4. La longueur du standard sera identique ou très proche de celle de l'ADN ou l'ARN cible. L'on veillera aussi à introduire dans la partie spécifique B un contenu  
20 en base AT et GC proche ou identique à celle de l'ADN ou l'ARN cible. Un exemple de standard utilisé pour la quantification d'un fragment d'ADN du virus CMV est donné dans la figure 5, et un exemple de standard à ARN pour la quantification d'une séquence d'ARN du virus HIV est montré  
25 à la figure 6.

Un tel standard permet également une utilisation comme standard externe ou comme standard interne pour l'amplification par PCR. En effet, leur similitude et identité partielle permet un taux  
30 d'amplification très proche ou identique à celui de l'ADN ou l'ARN cible. Ils possèdent des séquences matrice 3 pour les amorces 4 identiques, donc qui réaliseront leur

fixation (annealing) dans les mêmes proportions. Leur longueur identique, leur identité de séquence sur une grande distance et la similitude de la partie non commune en longueur et en rapport nombre de bases GC/nombre de bases AT fait que la lecture par l'ADN polymérase se réalisera avec la même efficacité. Dans le cas d'une utilisation comme standard interne, il possède également une propriété particulière. En effet, pendant la phase d'amplification, le ralentissement et l'arrêt de l'amplification de la séquence standard entraîne le même ralentissement pour la séquence cible et réciproquement. Ce ralentissement de l'efficacité à la fin du processus d'amplification peut être due à plusieurs raisons : la diminution du nombre d'amorces, du nombre de nucléotides libres, la baisse d'activité de la DNA polymérase ou la rehybridation trop rapide des amplicons entre eux plutôt qu'avec les amorces lors de l'étape de fixation des amorces (annealing). Toutes ces raisons sont équivalentes pour les 2 séquences et auront donc la même influence sur leur amplification. Cette dernière propriété est intéressante, car lorsque un des deux amplicons (par exemple le standard) sera en forte concentration, il se réassociera en double brin de préférence à la fixation sur les amorces plus petites et donc moins stables. Cependant, comme il possède une grande séquence commune avec l'autre amplicon (par exemple la cible), il reformera aussi des réassociations stables (hybrides) avec cet autre amplicon, ce qui inhibera de la même manière la fixation des amorces. Ainsi le design des standards compétitifs selon l'invention, permet une quantification indépendamment des cycles de la PCR. Un exemple est donné à la figure 15 montrant la possibilité de quantification après 25, 30, 35 et 40 cycles, moment où

l'amplification de la PCR n'est plus exponentielle.

Conjointement à leur utilisation pour l'amplification, la présence sur ces standards d'une partie commune A et d'une partie spécifique B est avantageusement adaptée à leur mesure selon la méthode "hybridation sandwich" sur support insoluble de l'invention, et cela avec une spécificité identique ou très proche de celle de l'acide nucléique cible (voir figure 4).

Les inventeurs ont observé que par l'hybridation sandwich de l'invention, le facteur limitant est la fixation des amplicons 1 et 2 sur la séquence trappeur 5 immobilisée. Celle-ci étant présente sur une surface, la vitesse de réaction est beaucoup plus lente du fait de la diffusion plus lente des réactifs à l'approche d'une surface rigide et aux encombrements stériques. Expérimentalement, on observe que l'on fixe moins de 50 % des amplicons 1 et 2 sur les séquences trappeur 5. Cependant, même si ce pourcentage de fixation est faible, on observe qu'il est le même pour le standard 1 et pour la cible 2. Cette propriété s'explique par le fait que les 2 séquences ont la même taille et qu'elles se fixent sur une séquence trappeur 5 de même type. La fixation des séquences spécifiques 6 marquées ne semble pas poser de problème, car il s'agit d'une sonde simple brin, mise en excès de manière à obtenir une fixation quantitative. Expérimentalement, on peut obtenir 90 % de fixation de ces séquences 6 marquées sur les amplicons 1 et 2 trappés dans les puits. De plus, la longueur identique de ces séquences 6 et leur contenu plus ou moins comparable en GC et la concentration identique utilisée font que les 2 séquences spécifiques 6 complémentaires du standard 1 et du cible 2 se fixent avec la même efficacité. Ainsi l'ensemble de l'hybridation

sandwich se réalise avec la même efficience pour les amplicons standards 1 et pour les cibles 2. Ceci est illustré expérimentalement à la figure 8.

On peut donc avantageusement utiliser ces standards comme standards externes puisque leur efficience d'amplification sera identique et leur mesure par hybridation sandwich également. Une expérience de ce type est montrée à la figure 9 dans laquelle des nombres de copies croissantes en CMV cible et standard ont été amplifiés par 40 cycles de PCR puis détectés par hybridation sandwich. On constate une évolution parallèle des deux courbes. On doit cependant souligner une certaine variabilité des résultats provenant essentiellement des variabilités de l'amplification d'un même échantillon au cours de la PCR comme explicité ci-dessus.

Dans le cas où le standard est utilisé comme standard interne (c'est-à-dire que après l'amplification par PCR, les tubes contiennent un mélange d'amplicons de standard et de cible) cette hybridation sandwich permet aussi une quantification de ces deux amplicons avec la même efficience en opérant de la manière suivante : la préparation contenant les 2 amplicons est diluée de manière adéquate et est ajoutée à 2 ou une double série de puits (ou filtres ou tubes) dans lesquels se trouve un ADN trappeur correspondant à tout ou une partie de la séquence commune des 2 amplicons. Dans un (ou une série de) puits, on ajoute une séquence marquée spécifique du cible et dans l'autre (ou 2ème série de) puits, on ajoute la séquence marquée spécifique du standard (voir figure 7).

Pour une dilution donnée, la fixation des deux amplicons sur l'ADN trappeur sera identique dans les 2 tubes puisqu'ils seront présents à la même concentration.

De plus comme le trappeur est commun aux deux amplicons et qu'ils ont une taille identique, leur fixation se réalisera avec le même rendement, c'est-à-dire que la proportion des 2 amplicons fixés sera identique à celle présente dans la  
5 préparation après PCR. Leur concentration relative aux fonds des puits ne dépendra donc que de leur concentration respective dans l'échantillon. Si l'on ajoute les séquences spécifiques marquées en excès de telle manière que leur fixation sur les amplicons soit quantitative, on obtiendra  
10 un marquage qui sera directement proportionnel à la concentration des amplicons dans la préparation.

On peut réaliser l'hybridation sandwich soit en deux étapes ou en une étape, en réalisant la fixation sur la séquence trappeur puis en ajoutant la séquence  
15 marquée spécifique ou en ajoutant ensemble la séquence marquée spécifique aux amplicons lors de l'immobilisation sur les séquences trappeurs.

L'utilisation de standards selon l'invention permet donc d'obtenir non seulement une amplification  
20 identique (ou très proche) du standard et de l'ADN cible mais également leur capture et leur détection en proportion identique dans les tubes servant à la mesure des amplicons cibles et des standards. La mesure des séquences marquées doit se faire par la suite de manière quantitative de  
25 manière à garder la quantification à toutes les étapes. Un schéma reprenant les diverses étapes de la démarche de quantification à l'aide de standards internes est présenté à la figure 7.

A côté des propriétés particulières lors de  
30 l'amplification par PCR résultant du design du standard interne citées ci-dessus, à savoir une efficience identique à celle de la cible de l'échantillon biologique ou une



indépendance par rapport aux nombres de cycles de PCR, la quantification par hybridation sandwich telle que proposée dans ce brevet et réalisée suivant un protocole représenté à la figure 7 apporte encore un avantage que l'on peut observer dans l'exemple 9 (dont les résultats sont présentés dans les figures 10 et 11). Dans cette expérience, une quantité constante de standard interne soit mille copies ont été ajoutés à des quantités croissantes de cibles CMV allant de 30 à un million de copies. Après 40 cycles d'amplification par PCR, les 2 séquences ont été mesurées après hybridation sandwich par mesure en spectrophotométrie. La figure 10 représente les données pour les standards et les cibles. On observe aux faibles concentrations en cible une présence importante du standard qui diminue au fur et à mesure que la quantité de cibles devient importante. Lorsque la quantité de cibles est égale à celle du standard soit mille copies, les deux valeurs sont pratiquement identiques. Puisque l'une des propriétés de l'invention est de pouvoir garder les rapports constants entre le standard et la cible à chacune des étapes de la quantification, les rapports des signaux obtenus pour la mesure de la séquence nucléotidique cible et standard ont été portés en fonction de la quantité de séquences cibles mise au départ. On obtient effectivement une relation linéaire, ce qui confirme bien la pertinence des résultats l'invention. Une propriété inattendue fut d'observer cette linéarité sur une échelle aussi importante de séquences nucléotidiques cibles. En effet, les résultats indiquent la possibilité de détecter quantitativement entre 30 et un million de copies de ces séquences cibles en utilisant au départ mille copies de séquences standards. Cette propriété constitue un avantage pratique important car les

échantillons biologiques peuvent contenir des quantités très variables de séquences nucléotidiques cibles à mesurer et dans ce cas, un dosage linéaire de plus de 4 ordres de grandeur permet de diminuer fortement, sinon totalement, le  
5 nombre de dilutions à réaliser pour se situer dans la zone de quantification.

La même démarche peut être réalisée lors de la mesure d'ARN par exemple des ARN messagers ou des ARN viraux. Dans ce cas, il faut utiliser un standard qui est  
10 constitué d'une chaîne d'ARN ayant les mêmes spécificités que le standard ADN explicité ci-dessus. La démarche de l'amplification et de la mesure requiert une étape préalable qui est la transformation de l'ARN en chaîne d'ADN par une enzyme ayant une activité de transcriptase  
15 inverse. La suite des opérations et la quantification est identique à celle explicitée ci-dessus. Un exemple de standard utilisé pour la quantification de l'ARN du virus HIV est donné à la figure 6 et la quantification de HIV présentée à l'exemple 11 et à la figure 13.

20 L'emploi de ces standards permet donc la quantification d'une séquence d'ADN (ou ARN) cible dans un échantillon et convient donc très bien à des tests de diagnostic ou de mesures d'ADN ou d'ARN en recherche ou dans des tests de routine. L'utilisation d'oligonucléotides  
25 comme standards externes est moins intéressante que leur utilisation comme standards internes et elle exige des contrôles et des conditions particulières. Il faut être certain que l'efficacité de l'amplification est identique pour l'échantillon et pour le tube contenant le standard  
30 externe; il faut aussi travailler dans la zone linéaire d'amplification afin de garder une proportionnalité entre le nombre d'amplicons obtenus et la quantité de séquences

présentes dans l'échantillon et le standard au départ. Il faudra également réaliser les tests en plusieurs exemplaires afin de minimiser les variations observées de tubes à tubes lors de l'amplification. Par contre on conserve les avantages donnés par la composition particulière de ce standard très semblable à la séquence d'acide nucléique cible pour obtenir une amplification et une détection identique ou très proche de celle de l'acide nucléique cible, ce qui permet la quantification de cette dernière.

En pratique, l'échantillon contenant l'ADN ou l'ARN cible est traité parallèlement à des tubes contenant des concentrations croissantes de standard externe. Toutes les conditions d'amplification et de détection sont identiques et faites avec les mêmes solutions afin de minimiser les variations de traitement. Les résultats sont comparés à la courbe d'étalonnage obtenue avec les standards. Dans l'invention, on privilégie une série de dilutions de l'échantillon cible afin d'obtenir des valeurs correspondant à la zone couverte par les standards.

L'utilisation des standards internes permet non seulement de tenir compte de variations qui se produisent de tube à tube lors de la PCR, mais aussi de possibles inhibitions de la PCR qui peuvent se produire dans des échantillons biologiques. Celles-ci sont en général dues à une inhibition de l'activité de la polymérase par des contaminants présents dans la préparation. Dans le cas d'inhibition de l'amplification, celle-ci se produira sur les 2 séquences, cible et standard, présentes dans le même tube et la proportion des amplicons sera donc conservée malgré un rendement d'amplification plus faible. De plus cette inhibition de la

PCR pourra être constatée et évaluée en comparant la mesure des amplicons du standard ajouté dans l'échantillon et celle du contrôle positif de la PCR. En cas d'inhibition, le signal du standard interne présent dans l'échantillon  
5 fortement dilué sera inférieur à celui du contrôle contenant le même nombre de copies du standard interne traité dans les conditions optimales de PCR.

En pratique on ajoute à l'échantillon contenant l'ADN ou l'ARN cible, une quantité connue de  
10 standard puis l'on traite la préparation pour l'amplification et la détection après hybridation sandwich. Un contrôle positif contenant le standard seul et un contrôle négatif sans ADN spécifique sont aussi réalisés pour chaque expérience. Le rapport du signal obtenu pour la  
15 mesure des amplicons cibles et pour les amplicons du standard est rapporté à une droite d'étalonnage (voir figure 11) qui permet de déterminer le nombre de copies d'ADN cible au départ.

Une méthode plus adéquate mais qui requiert  
20 plus de tests, consiste à diluer l'échantillon (par exemple 4 dilutions de 10 en 10) et d'y ajouter une quantité constante de standard interne. Pour certains échantillons biologiques, il est nécessaire d'extraire et même parfois de purifier les acides nucléiques avant l'amplification  
25 pour éviter une inactivation de la polymérase. Dans d'autres, le chauffage à 100 °C destiné à séparer les doubles brins d'ADN suffit. Le standard interne est normalement ajouté dans l'échantillon de départ. Il peut éventuellement, pour des raisons pratiques être ajouté  
30 après extraction si celle-ci est quantitative. C'est le cas où les acides nucléiques sont extraits d'un échantillon puis que l'on réalise 4 dilutions avant d'ajouter une

quantité constante de standards internes avant de faire la quantification comme dans l'exemple 10 et la figure 12. Cette manière de procéder ne nécessite qu'une seule extraction de l'échantillon. Après amplification et  
5 détection après hybridation sandwich, les rapports entre les signaux des amplicons cibles et standards sont portés en fonction de la dilution du cible. Ces 4 points déterminent une droite qui permet de déterminer la valeur du rapport égale à 1 pour lequel, la quantité de cible  
10 équivaut à celle du standard. Cette manière de réaliser la quantification est optimale. Un exemple est explicité ci-dessous et présenté à la figure 12.

Exemple 1 : Influence de la longueur du trappeur pour une  
15 hybridation simple d'un ADN cible de HPV-18

L'expérience a été réalisée sur des amplicons de 586 paires de base correspondant à une séquence de HPV-18 située en position 6193 à 6779 de l'ADN viral. Cette séquence a été amplifiée par les amorces suivantes :

- 20 1 = 5' TTTTGGAAGATGGTGATATGG 3'  
2 = 5' CATAACATCTGCAGTTAAAGT 3'

L'hybridation a été réalisée à partir de ces amplicons marqués à l'extrémité 5' terminale par l'intermédiaire de la T4 polynucléotide kinase en présence  
25 de [ $\gamma$ ATP-au  $^{32}$ P].

Deux types de trappeurs ont été utilisés, correspondant à 180 et 360 bases complémentaires de la séquence des amplicons. Les hybridations ont été réalisées en présence de concentrations croissantes d'amplicons de  
30 cible à 45 °C pendant 20 heures dans une solution constituée de SSC 2x concentré, de Denhart 5x concentré, de

DNA de sperme de saumon dénaturé à 0,1 mg/ml.

Des concentrations des amplicons allant de 0,13 à 13 fmoles ont été testées, et la quantité fixée a été mesurée en radioactivité. Rapporté en pourcentage d'ADN  
5 fixé, ceci représente 30% sur le trappeur de 180 bases et 50% sur le trappeur de 360 bases quelles que soient les concentrations en cible testées.

Le fait que ce pourcentage soit stable entre 0,13 et 13 fmoles indique également que la quantité de  
10 trappeur n'est pas limitante.

Exemple 2 : Effet de la longueur du trappeur sur une hybridation simple d'un ADN cible de CMV

L'expérience a été réalisée pour une  
15 hybridation d'amplicons de 435 paires de base correspondant à une séquence de CMV en position 171075 du génome (souche AD169, référence GENBANK X17403).

Cette séquence a été amplifiée par les amorces suivantes :

20 MIE4 : sens : 5' CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAG

MIE5 : antisens : 5' CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG

comme décrit par Demmler et al. (J. Infect. Dis., 158, pp; 1177-1184 (1988)) et marquées au <sup>32</sup>P en utilisant lors de l'amplification par PCR des dCTP marqués au <sup>32</sup>P. Les  
25 trappeurs de 50, 100, 150 et 250 bases ont été produits par PCR et correspondent à la partie 3' terminale des amplicons.

L'hybridation a été réalisée à 60 °C pendant 2 heures dans une solution de SSC 2x concentré et de  
30 Denhart 5x concentré en présence de 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon. Une quantité de 10 fmoles d'amplicons <sup>32</sup>P

a été ajoutée à chaque puits. Après réaction, les puits ont été découplés et la radioactivité mesurée. Les résultats montrent que pour les trappeurs de 50, 100, 150 et 250 bases, on obtient respectivement 0,09; 0,035; 0,53 et 1,55 fmoles de séquence cible hybridée. On observe bien un effet spectaculaire de la longueur du trappeur sur l'hybridation.

Exemple 3 : Influence de la longueur du trappeur pour une hybridation en sandwich d'un ADN cible de HPV-18

L'expérience a été réalisée pour l'hybridation d'amplicons de 586 paires de base correspondant à une séquence de HPV-18 située en position 6193 à 6779 de l'ADN viral. Cette séquence a été amplifiée par les amorces décrites à l'exemple 2.

Trois types de trappeurs ont été utilisés, correspondant à une séquence de 25, 180 et 360 bases complémentaires de la séquence des amplicons.

Les divers trappeurs reconnaissaient la partie des amplicons situés du côté 3' terminale. Les sondes comprenaient soit 360 bases pour l'hybridation sur le trappeur de 180 bases, soit 180 bases pour l'hybridation sur le trappeur de 360 bases, soit 21 bases pour l'hybridation sur le trappeur de 25 bases. Elles ont été marquées au  $^{32}\text{P}$  par phosphorylation en position 5' terminale par la T4 kinase en présence de  $^{32}\text{P}$ ATP. Elles correspondaient à l'extrémité 5' terminale de la séquence cible. Les sondes de 21 bases étaient simple brin, alors que les sondes de 180 et 360 bases étaient double brin. Les hybridations en sandwich ont été optimisées en ce qui concerne la température, la concentration en sels et la

concentration en amplicons. En ce qui concerne le trappeur de 25 bases, l'hybridation réalisée à 45 °C en présence de 2,5 fmoles d'amplicons pendant 2 heures dans une solution de SSC 2x concentrée puis après lavage incubé pendant 2  
5 heures avec 15 fmoles de sonde marquée au  $^{32}\text{P}$ . On obtient une fixation de 0,280 fmoles avec un coefficient de variation de 80%. L'hybridation sur les trappeurs de 180 et 360 bases s'est faite en une seule étape et dans les conditions suivantes : les amplicons ont été ajoutés  
10 respectivement à raison de 2,5 fmoles en présence de 15 fmoles de sonde marquée. L'hybridation s'est déroulée pendant 20 heures d'une solution SSC 2x concentrée à 45 °C. La quantité de sonde marquée hybridée est de 0,54 fmoles pour le trappeur de 180 bases et de 0,69 fmoles pour le  
15 trappeur de 360 bases. La différence de fixation de la sonde était due à un rendement plus élevé de l'hybridation de la séquence cible sur le grand trappeur (cf. exemple 2).

En effet, si l'on rapporte la fixation de la sonde marquée par rapport à la quantité de séquence cible  
20 trappée, on obtient dans les deux cas un rapport de 0,8. Ceci signifie que 80% des séquences cibles hybridées sur la séquence capteur ont fixé les séquences marquées. On constate donc dans cet exemple qu'il est possible d'utiliser des sondes de détection marquées, même double  
25 brin, et d'obtenir un très bon rendement de leur hybridation (80%). Le facteur limitant pour la formation du sandwich dans ces conditions est alors la longueur de la sonde capteur.



Exemple 4 : Influence du recouvrement de la séquence nucléotidique cible par l'ADN trappeur et l'ADN sonde pour le rendement de l'hybridation (exemple de Mycobacterium tuberculosis)

5

Dans cet exemple, l'ADN extrait de Mycobacterium tuberculosis a été amplifié par sa séquence Mt 308 en utilisant les amorces suivantes :

T2MT3' (amorce 5'-3') :

10 GTCGACACGCCTCTGCACGGAAGTCCTT

DMT3' (amorce antisens 5'-3') :

GCTCGACTTCTGGTCACGACGTCCGTCGAA

Ces amorcés ont été utilisées par Thierry et al. (Mol. Cell. Probes, 6, p. 181 (1992)), et permettent l'amplification d'un fragment de 279 paires de base.

15

Le trappeur a été obtenu en utilisant la sonde T2MT3' phosphorylée en position 5' et une amorce antisens SMT5' : GGGCATCCGCGAGTTGAAGACCTGAAGTGG.

Ces deux amorces permettent la production d'amplicons de 144 paires de base, dont l'un des deux brins possède un phosphate en 5'. Celui-ci a servi à fixer le trappeur par un brin covalent sur l'amine des multipuits comme expliqué à l'exemple 1.

Deux sondes marquées ont été réalisées, l'une de 135 paires de base obtenue par l'utilisation d'une amorce antisens GSMT5' portant une biotine :

TCATTGGCAACGTTTGCGCCCTGCCTTGGG

et l'autre par l'amorce antisens DMT3'. L'autre sonde était simple brin et portait également une biotine :

30 5' CAGCCACCAAGTCGAGCACTTTGCGGCGGAAGTACTCGGG-biotine 3'

L'hybridation sandwich a été réalisée en ajoutant dans chaque puits 54 fmoles d'ADN cible amplifié

par PCR en présence de 50 ng de sonde de 40 bases et de 25 ng pour la séquence de 135 bases. L'hybridation a été effectuée pendant 2 heures à 60 °C.

Après lavage, le conjugué streptavidine-  
5 kinase a été ajouté et après 45 minutes d'incubation, l'activité de la kinase a été dosée en bioluminescence comme décrit dans la demande de brevet WO94/06933.

La lecture est faite pendant une heure. On obtient après soustraction du blanc une valeur de 1,5  
10 million de RLU (Relative Light Unit) pour la sonde de 40 bases et de 2,7 millions de RLU pour la sonde de 135 bases.

Dans cet exemple, la sonde de 135 bases était double brin et mise en quantité plus faible. Malgré ces deux conditions défavorables, le signal obtenu est presque  
15 deux fois supérieur, ce qui indique bien l'importance de réaliser une grande sonde de détection qui recouvre l'entièreté de la séquence cible.

Exemple 5 : Courbe de concentrations en amplicons de CMV  
20 après hybridation sandwich

Les amplicons provenant de l'ADN de CMV ont été obtenus à partir d'une PCR réalisée avec les amorces MIE4 et MIME5 décrites dans l'exemple 2. Elles permettent d'obtenir des amplicons de 435 paires de bases. Les  
25 amplicons ont servi pour réaliser la courbe d'hybridation sandwich décrite ci-dessous. Celle-ci a été réalisée sur des plaques multipuits sur lesquelles étaient fixés des trappeurs complémentaires à cette séquence cible et une sonde biotinylée de 185 bases produite également par PCR.  
30 La taille du trappeur était de 257 bases. Ils ont été produits à partir d'une PCR utilisant des amorces MIE4 décrites à l'exemple 3 et MEI-6 dont la séquence était :

GTACAGGGGACTCTGGGGGTGAC

Le trappeur une fois produit est purifiée sur spin colonne G25.

La fixation covalente du trappeur sur le polystyrène se fait comme suit : chaque puits contenant 100 ng de trappeur dénaturé, MIEM 0.01 M pH 7,5, carbodiimide 0,2 M. Ces puits sont incubés 5 heures à 50 °C. Après incubation, deux lavages avec 200 µl de NaOH 0,2 N, un lavage à l'eau et un séchage sont réalisés. Pour l'hybridation, les puits sont dénaturés avec 200 µl de NaOH 0,2 N et rincés avec 200 µl de SSC 2x.

Le volume total d'hybridation par puits est de 110 µl, contenant :

- 50 µl de tampon d'hybridation : SSC 4.4x, Denhart 10x, ADN de sperme de saumon 200 µg/ml dénaturé 10 minutes à 100 °C ;
- 10 µl de sonde biotinyllée à une concentration de 900 pg/10 µl dénaturée 10 minutes à 100 °C ;
- 50 µl d'ADN cible amplifié par PCR en utilisant deux amorces MIE4 et MIE5 décrites à l'exemple 3, non purifié et dénaturé 10 minutes à 100 °C. Les quantités testées vont de 3,5 attomoles à 3500 attomoles.

L'hybridation dure 2 heures à 70 °C.

Après hybridation, les puits sont lavés deux fois avec 200 µl de SSC 0,1x puis avec 200 µl de tampon maléate 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,3% pH 7,5 durant 15 minutes.

Après rinçage avec 200 µl de tampon maléate 100 mM pH 7,5 contenant NaCl 150 mM et du blocking reagent 1%, 100 µl de streptavidine-kinase sont ajoutés. Les puits sont rincés avec 400 µl de tampon maléate 100 mM pH 7,5

contenant NaCl 150 mM, Tween 0,3% pendant 10 minutes puis 3 fois 5 minutes avec 200 µl de tampon maléate 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,3% pH 7,5.

L'activité de la kinase est révélée dans du  
5 Tris buffer 20 mM pH 7,75 contenant du DTT 60 µM, EDTA 100 µM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Luciferine 8 µM, luciférase 6 mU par puits KCl 20 mM, Phosphoenolpyruvate 1 mM et ADP 3,2 µM. L'émission de lumière est suivie pendant une heure avec un luminomètre (Luminoskan, Labsystem, Finlande) et les  
10 résultats sont exprimés en RLU.min.

Exemple 6 : Hybridation différentielle d'un petit et d'un long brin d'ADN ayant une partie de sa séquence identique

15 Lors de certaines amplifications comme la CPR, les sondes de départ marquées sont grandes et sont coupées en deux morceaux qu'il faut pouvoir détecter et mesurer. Le problème est donc de pouvoir mesurer par hybridation une petite sonde en présence de sa séquence  
20 mère qui est plus grande. Les inventeurs ont choisi dans cet exemple une séquence mère (OL1) biotinylée de 40 bases qui ont la séquence suivante :

5' CCGCGACTATCCCTCTGTCCTCAGTAATTGTGGCTGAGAA 3'

Cette séquence correspond à une séquence  
25 spécifique du génome de CMV située sur le "Major Immediate Early Gene" (Akriegg et al., Virus Res. 2, p. 107). Les inventeurs ont voulu détecter une sonde biotinylée (OL2) correspondant aux 20 premières bases de cette sonde en présence de la séquence mère (OL1). Le trappeur était  
30 constitué d'un oligonucléotide de 20 bases complémentaires à la sonde OL2 et terminée par un groupement phosphate en 5'. Ce trappeur a été fixé sur les multipuits aminés par

réaction covalente.

Dans l'expérience suivante, 100 fmoles de deux des séquences biotinylées OL1 ou OL2 ont été incubés pendant 2 heures à 45 °C dans une solution de SSC 0,5x concentrée (soit 75 mM NaCl et 7,5 mM de nitrate de Na). Après l'hybridation, les puits ont été lavés par une solution de SSC 0,1x concentré à 45 °C. Après quatre lavages, les puits sont incubés avec le conjugué streptavidine-kinase et sa fixation est estimée par la mesure de l'activité kinase en bioluminescence. Dans ces conditions, les puits ayant le grand fragment (OLA) montraient une RLU x min de 9 alors que les petits fragments montraient une RLU x min de 210. La présence sur OL1 d'une séquence de 20 nucléotides supplémentaires sur OL1 situés du côté 5' par rapport à OL2, c'est-à-dire du côté du plastique, déstabilise donc fortement l'hybridation de cette sonde sur le trappeur.

Exemple 7 : Mesure de la quantité d'ADN cible et de standard par hybridation sandwich et mesurés en spectrophotométrie

L'ADN cible à mesurer consiste en un oligonucléotide double brin de 314 paires de bases correspondant à la position 171193 du génome du CMV (souche 10169, référence GENBANK X17403).

Le standard interne consiste en un oligonucléotide double brin de 314 paires de bases dont la séquence en nucléotides est identique à celle de l'ADN cible à mesurer excepté pour les 40 nucléotides allant de 3217 à 3256 qui constituent une séquence aléatoire mais dont le pourcentage en GC est similaire à celui de l'ADN

cible.

La composition de ces nucléotides est présentée à la figure 5. Ces nucléotides sont d'abord chauffés à 100 °C pendant 10 min puis incubés en concentration croissante dans des puits auxquels ont été fixés des sondes capteurs de l'invention et correspondant à une partie de la séquence commune et fournis par Lambdatech (Namur-Belgium). La solution d'hybridation de 0,06 ml par puit contient une solution SSC 2 fois concentrée, du Denhardt 5 fois concentré, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé et 50 ng de sonde biotinylée de 40 nucléotides simple brin correspondant soit à la séquence complémentaire de l'ADN cible, soit à celle de l'ADN standard présentée à la figure 7. A ces 60 µl on ajoute 40 µl d'ADN cible ou standard. L'hybridation se déroule à 70 °C pendant 2 heures.

Après hybridation, les puits sont lavés 1 fois avec 0,2 ml de solution SSC 0,1 fois, puis une fois avec 0,2 ml de tampon maléate pH 7,5 contenant 0,15 M NaCl et du Tween 0,3 % et enfin avec du tampon Maléate pH 7,5 NaCl 0,15 M et contenant 1 % de poudre de lait.

Un conjugué streptavidine-peroxydase est ajouté dans 0,1 ml à une dilution 1/1000 comme recommandé par le fournisseur (BIOSOURCE - Fleurus - Belgique) puis lavés 3 fois avec 0,2 ml de tampon Maléate 0,1 M pH 7,5 contenant 0,15 M NaCl et 0,3 % de Tween puis 1 fois avec une solution de glycine 500 mM pH 7,7 contenant du KCl 100 mM et MgCl<sub>2</sub> 1M.

L'activité de la peroxydase est mesurée par l'oxydation du TMB en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un 1,1 ml de tampon acetate-citrate 0,2 M pH 7,5.

Après 10 min de réaction, 0,22 ml d'une solution de  $H_2SO_4$  1,2 M est ajouté à chaque puits et la densité optique est mesurée à 450 nm. Les résultats de l'exemple sont présentés à la figure 8.

5

Exemple 8 : Mesure de la quantité d'ADN cible de CMV par utilisation d'un standard externe par hybridation sandwich après amplification par PCR

10 De l'ADN du virus de CMV contenu dans un plasmide dont on connaissait le nombre de copies a été placé en concentrations croissantes dans les tubes pour la PCR. Parallèlement, on prépare des tubes contenant des concentrations croissantes de standard externe tel que  
15 défini à la figure 5. Tous les tubes ont subi une PCR de 40 cycles en utilisant des amorces correspondant à la séquence 3191-3217 et 3504-3481 du gène de CMV (figure 5). La PCR démarre par 1 passage 3 min à 94 °C et se poursuit avec 40 cycles définis comme suit :

20 Chaque cycle de PCR comprenait une température de dénaturation à 94 °C pendant 30 sec, une période d'appariement des amorces à 65 °C pendant 30 sec et une polymérisation de 30 sec à 72 °C. La solution de PCR de 0,1 ml comprenait 100 pmoles de chacun des 2 amorces, 200  
25 mM des divers dNTP et 2,5 U de Taq DNA polymérase dans un tampon TRIS-HCl 10 mM pH 8,4 avec  $MgCl_2$  1,5 mM et KCl 50 mM, DMSO 2 %. A la fin des 40 cycles, les tubes PCR passent 10 min à 72 °C.

Après amplification, 0,04 ml de la solution  
30 fut prélevée afin de réaliser l'hybridation sandwich sur la sonde trappeur fixée sur les multipuits commune aux deux

amplicons. La présence d'amplicons cible et d'amplicons standard fut mise en évidence grâce à une sonde de 40 bases biotinylée spécifique de chacune des 2 séquences (figure 5).

5 La réalisation s'est faite en utilisant un conjugué streptavidine-kinase et en mesurant l'activité de la kinase bioluminescence. Les conditions expérimentales pour l'hybridation et la révélation sont celles de l'exemple 7 mais en utilisant un conjugué streptavidine-  
10 kinase qui permet la production de lumière en présence de luciférase comme décrit dans la demande de brevet WO94/06933. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 9. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures. On remarque une corrélation entre le nombre de copies de  
15 départ et le signal obtenu. De plus, les courbes obtenues pour la cible et le standard sont très proches, ce qui permet d'utiliser la courbe du standard comme référence pour déterminer le nombre de copies du DNA cible CMV dans l'échantillon de départ.

20

Exemple 9 : Mesure de la quantité d'ADN cible de CMV par utilisation d'un standard interne par hybridation sandwich après amplification par PCR

25 Afin de valider la méthode de mesure d'un ADN cible dans un échantillon en utilisant un standard interne et une amplification par PCR comme schématisée à la figure 7, on établit une courbe de standardisation de la manière suivante.

30 Dans chacun des tubes ont été ajoutées des quantités croissantes d'un plasmide contenant une partie du génome du virus CMV et une quantité constante de standard



interne soit équivalent à 1 000 copies. Les quantités d'ADN cible CMV correspondaient à 30, 100, 300, 1 000, 3 000, 10 000, 30 000, 100 000, 300 000, et 1 million de copies.

La composition du standard interne est donnée à la figure 5. Chaque tube a été soumis à une amplification par 40 cycles de PCR dans les conditions présentées à l'exemple 15 en utilisant les amorces correspondant à la séquence 3191-3217 et 3504-3481 du gène de CMV (figure 5). Après amplification, on obtient donc des amplicons de 314 paires de bases correspondant au cible CMV et au standard. De chacune des solutions de PCR, 0,04 ml sont prélevés et incubés dans 2 puits contenant un trappeur identique pour les séquences communes des 2 amplicons. Dans l'un des puits, est ajouté la sonde biotinylée de 40 bases spécifique du cible CMV et dans l'autre la sonde biotinylée de 40 bases spécifique du standard.

Après hybridation sandwich, un conjugué streptavidine-peroxydase est ajouté à chaque tube et l'activité de la peroxydase mesurée comme dans l'exemple 7 par la mesure de la densité optique (D.O.) correspondant à l'absorbance du produit de réaction de la peroxydase (figure 10). Pour chaque PCR, le rapport entre la D.O. correspondant à la détection des amplicons cibles et celle correspondant à la détection des amplicons standards est déterminé et porté en fonction du nombre de copies de CMV présent au départ de l'expérience. Les résultats sont présentés à la figure 11 en échelle logarithmique afin de couvrir l'ensemble des concentrations. Chacun des points représente la moyenne de 3 expériences. On observe une très bonne linéarité avec un coefficient de régression de 0,97 pour la droite, ce qui signifie la possibilité de déterminer la quantité de CMV cible dans un échantillon de

départ allant de 30 à 1 million de copies.

Exemple 10 : Indépendance du nombre de cycles de PCR pour la mesure d'un ADN cible de CMV par utilisation d'un standard interne et hybridation sandwich

Cette expérience a été réalisée essentiellement selon l'exemple 9 et le schéma de la figure 7, c'est-à-dire en utilisant au départ un échantillon contenant 100 000 copies d'ADN de CMV dilué de 10 en 10 fois et auquel nous avons ajouté 1 000 copies de standard. Chacun de ces tubes a été soumis à une PCR comme dans l'exemple 5 excepté que certains tubes ont été arrêtés après 25, 30, 35, ou 40 cycles de PCR. Après la PCR, les amplicons ont été utilisés pour une hybridation sandwich sur un même trappeur mais avec soit une sonde biotinylée spécifique du CMV cible ou du standard. La révélation s'est faite en bioluminescence en utilisant un conjugué streptavidine-kinase et mesure de la lumière émise par la luciférase.

Le rapport des signaux lumineux (RLU) émis par les puits utilisant la sonde du cible et ceux utilisant la sonde standard ont été portés en fonction de la dilution du cible de départ (figure 12). Pour une même PCR, on observe la linéarité des 4 points, ce qui signifie la détection possible dans ce cas du CMV cible entre 100 et 100 000 copies. Cette linéarité est retrouvée pour les 4 PCR comprenant 25-30-35 ou 40 cycles, ce qui signifie l'indépendance de cette quantification par rapport au nombre de cycles d'amplification de la PCR.

Exemple 11 : Mesure de la quantité d'ARN cible et de standard par hybridation sandwich

L'ARN cible à mesurer consiste en un acide nucléique simple brin de 267 bases correspondant à la  
5 séquence nucléotidique allant de 4235 à 4481 du gène de la polymérase (Pol) du virus du Sida (HIV) (numérotation de HIV-LAI : Los Alamos HIV data bank ACK02013).

Le standard consiste en un acide nucléique simple brin ARN dont la composition en nucléotides est  
10 identique à celle de l'ARN cible à mesurer à l'exception de 38 nucléotides allant de la position 4367 à 4404, constituant une séquence aléatoire dont le pourcentage en GC est similaire à celui de l'ARN cible. La composition de ces ARN est présentée à la figure 8.

15 Le standard ARN est préparé par transcription *in vitro* à partir d'un plasmide possédant en 5' le promoteur d'une ARN polymérase et en 3' d'une séquence poly A. Après purification et quantification de ce dernier, un nombre de copies croissant de standard ARN est placé dans  
20 chaque tube en présence d'une quantité fixe d'ARN cible.

Chaque tube est soumis à une première étape de transcription inverse (AMV-RT, Avian Myeloblastosis Virus) pour la synthèse du premier brin ADN (amorce 4481-4501) et dans une seconde étape à la synthèse du second  
25 brin d'ADNc ainsi que l'amplification de l'ADN (Tfl ADN polymérase *Thermus flavus*; System Access RT-PCR Promega) (amorces 4235-4256; 4481-4501). Un tampon de réaction optimisé pour les deux étapes simplifie la procédure et réduit le risque de contamination.

30 La procédure d'amplification comprend dans une première étape la transcription inverse à 48 °C pendant 60 min, suivie d'une étape d'inactivation de l'AMV-RT et de

la dénaturation des hybrides ARN/ADNc à 94 °C pendant 2 min. Ensuite, la synthèse du second brin d'ADNc et la PCR sont réalisées par une amplification de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94 °C pendant 30 sec, 5 un appariement des amorces à 50 °C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72 °C pendant 30 sec. La réaction de RT-PCR se déroule dans 50 µl de solution comprenant en concentration finale 1 µM de chacune des 2 amorces, 0,2 mM de dNTPs, tampon de réaction AMV/Tfl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 u/µl 10 AMV-RT et 0,1 u/µl Tfl ADN polymérase.

Après amplification, l'hybridation sandwich est réalisée sur la sonde trappeur commune aux deux amplicons fixée sur les multipuits. La présence d'amplicons cibles et standards fut mise en évidence grâce à une sonde 15 de 38 bases biotinylée et spécifique de chacune des 2 séquences. La révélation est faite en bioluminescence en utilisant un conjugué streptavidine-kinase et mesure de la lumière émise par la luciférase (cfr. exemple 11).

Les résultats d'une telle expérience dans 20 laquelle 3 concentrations différentes de standards internes de 10<sup>10</sup>, 10<sup>8</sup>, et 10<sup>6</sup> copies ont été ajoutées à une concentration fixe de 10<sup>8</sup> copies d'ARN de HIV cible sont montrés à la figure 13.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection et/ou de quantification d'une séquence nucléotidique cible (2) présente dans un échantillon biologique caractérisé en ce  
5 qu'il comprend une mise en contact de type "sandwich" de la séquence nucléotidique cible (2) avec une séquence nucléotidique monobrin trappeur (5) fixée sur un support solide insoluble (3) et complémentaire d'une partie (7) de ladite séquence nucléotidique cible (2) et avec une ou  
10 plusieurs séquences (6, 11) nucléotidiques dont au moins une est marquée (6), la ou lesdites séquences nucléotidiques (6, 11) étant complémentaires d'une autre partie (8) de la séquence nucléotidique cible (2); en ce que la séquence nucléotidique trappeur (5) est fixée de  
15 manière covalente par l'une de ses extrémités sur le support solide (3), comporte une longueur comprise entre 50 et 500 bases; et en ce qu'une partie (10) de la séquence nucléotidique trappeur (5) qui ne s'hybride pas avec la partie (7) de la séquence nucléotidique cible (2) est  
20 inférieure à 60 bases, de préférence inférieure à 40 bases, plus particulièrement inférieure à 20 bases.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisée en ce que la longueur de la séquence nucléotidique trappeur (5) est comprise entre 100 et 300  
25 bases, de préférence entre 120 et 250 bases.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le rendement d'hybridation de la séquence nucléotidique cible (2) sur la séquence nucléotidique trappeur (5) est supérieur à 40%.

30 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'une partie (13) de la séquence nucléotidique cible ne s'hybridant pas

avec la séquence nucléotidique trappeur (5) et avec la ou les séquences nucléotidiques marquées (6) ou non (11) est inférieure à 60 bases, de préférence inférieure à 40 bases.

5 Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le support solide (3) est un support choisi parmi le groupe constitué par des tubes, des filtres, des billes, éventuellement magnétiques, des plaques de multipuits ou un mélange d'entre eux.

10 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique cible (2) est un amplicon résultant d'une amplification préalable par un procédé d'amplification génétique, de préférence choisi parmi le  
15 groupe constitué par la PCR, la LCR, la CPR, la NASBA ou l'ICR.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la partie terminale 5' (9) de la séquence cible (2) non recouverte par la ou les séquences  
20 nucléotidiques marquées (6) est recouverte par une séquence primer (12) utilisée pour son amplification.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte également une mise en contact de type sandwich  
25 d'une séquence nucléotidique standard (1) dans les mêmes conditions que les séquences nucléotidiques cibles (2) à détecter et/ou quantifier et comporte une étape supplémentaire de quantification du rapport entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible (2)  
30 et le marquage spécifique de la séquence nucléotidique standard (1).

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte également une étape d'une préparation d'une quantité connue d'une séquence nucléotidique standard (1) possédant au moins une partie commune (A) à la séquence nucléotidique cible (2) et une partie spécifique (B) dont la séquence est différente, et possède un contenu en bases GC/AT proche, de préférence identique, à la séquence d'une partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2), une extraction éventuelle de la séquence nucléotidique cible (2) à quantifier de l'échantillon biologique et une mise en contact de type "sandwich" des séquences nucléotidiques cible (2) et standard (1) avec des séquences nucléotidiques trappeur (5) complémentaires de la partie commune (A) de ces deux séquences (1, 2) et avec des séquences nucléotidiques marquées (6) complémentaires soit de la partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2), soit de la partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique standard (1), et une quantification entre le marquage spécifique de la séquence nucléotidique cible (2) et le marquage spécifique de la séquence nucléotidique standard (1).

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'hybridation sandwich s'effectue en deux étapes.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fixation de la séquence nucléotidique trappeur (5) sur le support solide (3) s'effectue par un phosphate 5' terminal sur une fonction amine du support solide (3) par réaction avec du carbodiimide.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la

séquence nucléotidique cible (2) est un ADN.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique cible est un ARN.

5 14. Trousse de détection et/ou de quantification par hybridation de type "sandwich" d'une séquence nucléotidique ciblée (2) comprenant une séquence nucléotidique trappeur (5) fixée sur un support solide insoluble (3) et complémentaire d'une partie (7) de ladite  
10 séquence nucléotidique cible (2) et au moins une séquence nucléotidique marquée (6) complémentaire d'une autre partie (8) de la séquence nucléotidique cible (2), caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique trappeur (5) est fixée de manière covalente par l'une de ses extrémités sur le  
15 support solide (3) et comporte une longueur comprise entre 50 et 500 bases et en ce que la partie (10) de la séquence nucléotidique trappeur (5) qui ne s'hybride pas avec une partie (7) complémentaire de la séquence nucléotidique cible (2) est inférieure à 60 bases, de préférence  
20 inférieure à 40 bases, plus particulièrement inférieure à 20 bases.

15. Trousse selon la revendication 14, caractérisée en ce que la longueur de la séquence nucléotidique trappeur (5) est comprise entre 100 et 300  
25 bases, de préférence entre 120 et 250 bases.

16. Trousse selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le support solide (3) est un support solide insoluble choisi parmi le groupe constitué par des tubes, des filtres, des billes, éventuellement magnétiques,  
30 des plaques de multipuits ou un mélange d'entre eux.

17. Trousse selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce qu'elle comporte



une séquence nucléotidique standard (1).

18. Trousse selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique standard (1) possède au moins une partie commune (A) à la séquence nucléotidique cible (2) à quantifier et une partie spécifique (B) dont la séquence est différente et possède un contenu en base GC/AT proche, de préférence identique, à la partie spécifique (B) de la séquence nucléotidique cible (2) à quantifier.

19. Trousse selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique trappeur (5) est fixée par un phosphate 5' terminal sur une fonction amine du support solide (3) par réaction avec du carbodiimide.

1/12

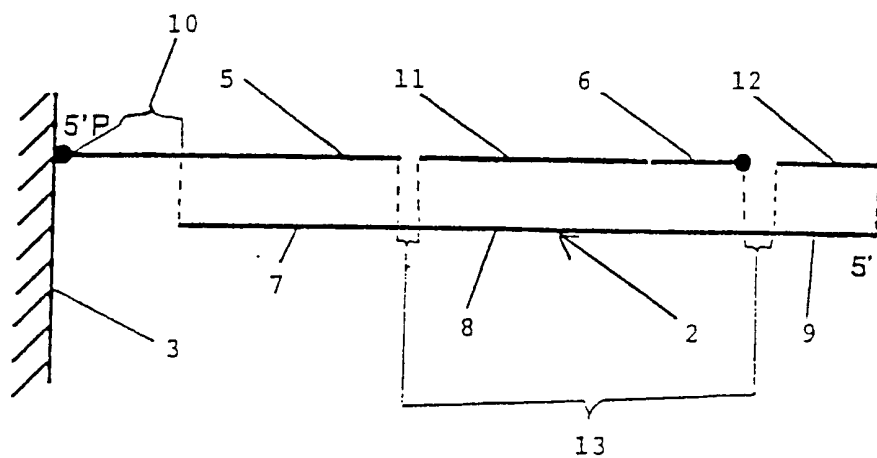


FIG. 1

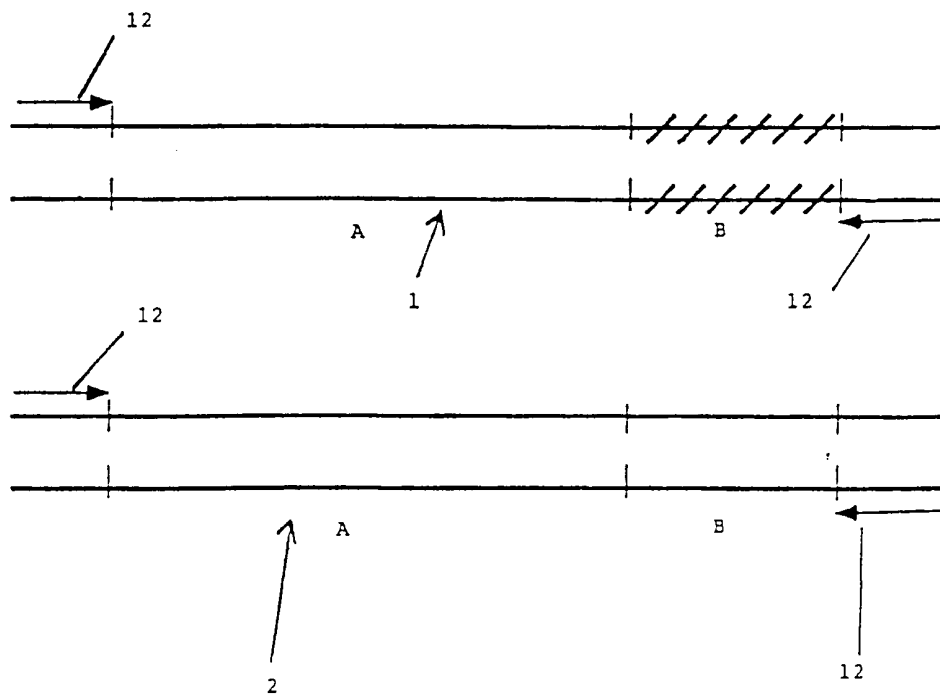


FIG. 4

2/12

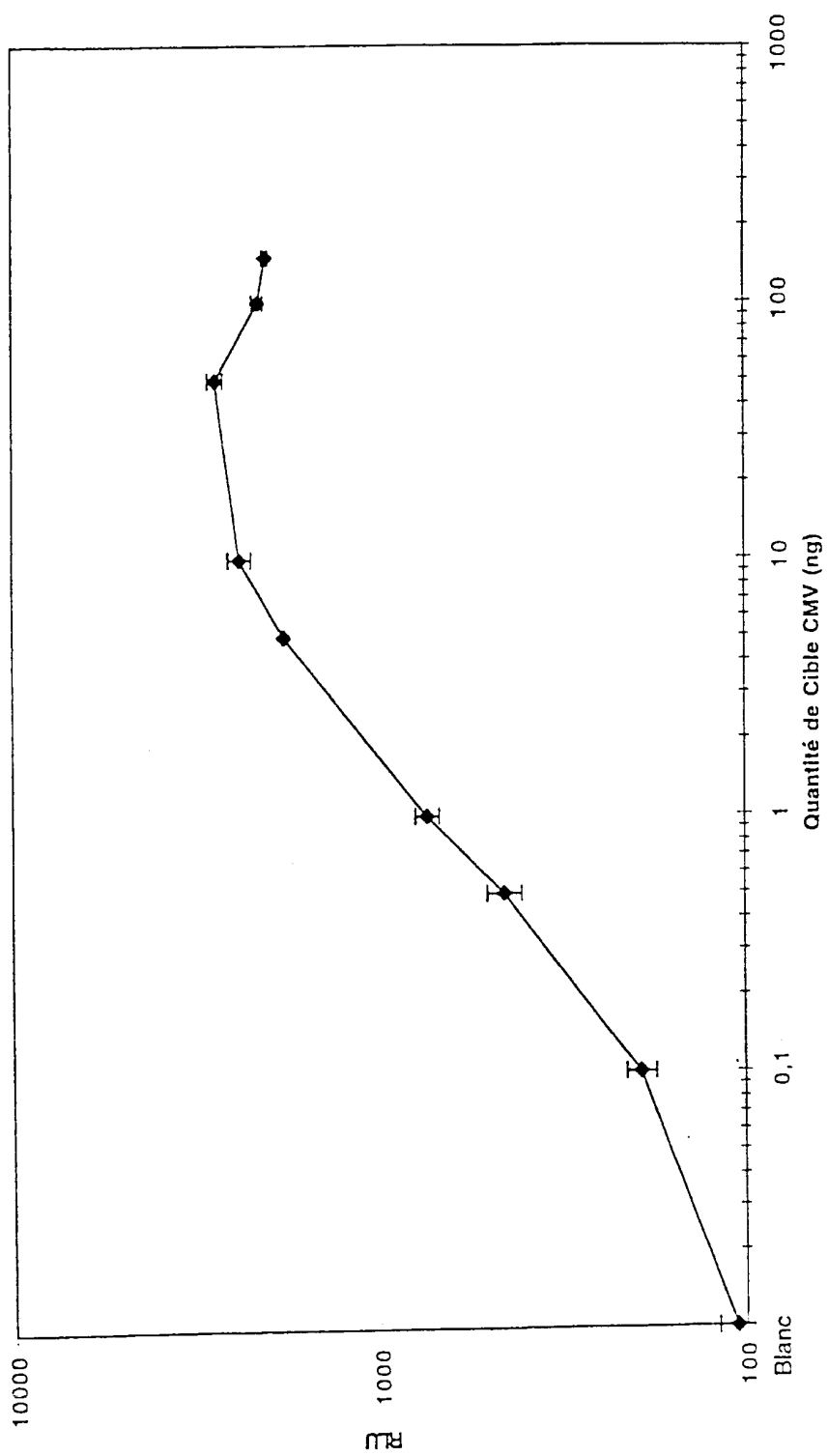


FIG. 2

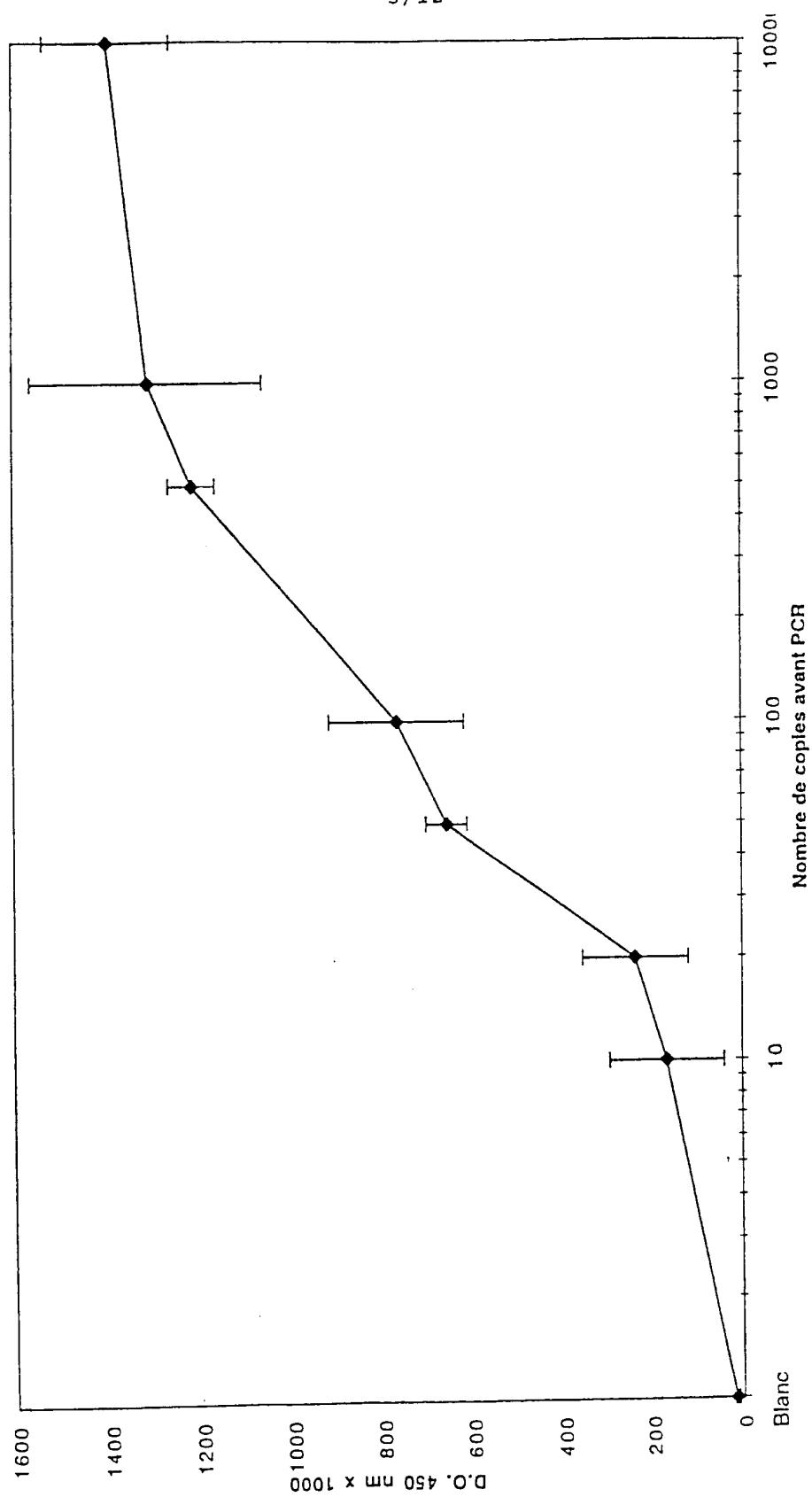
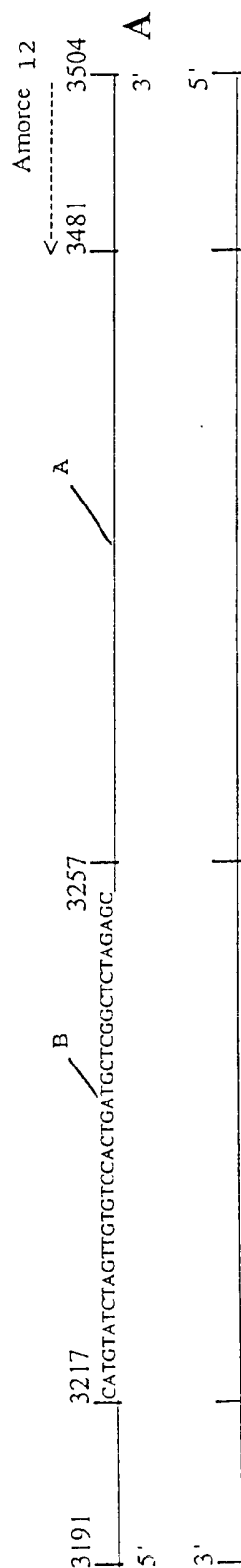
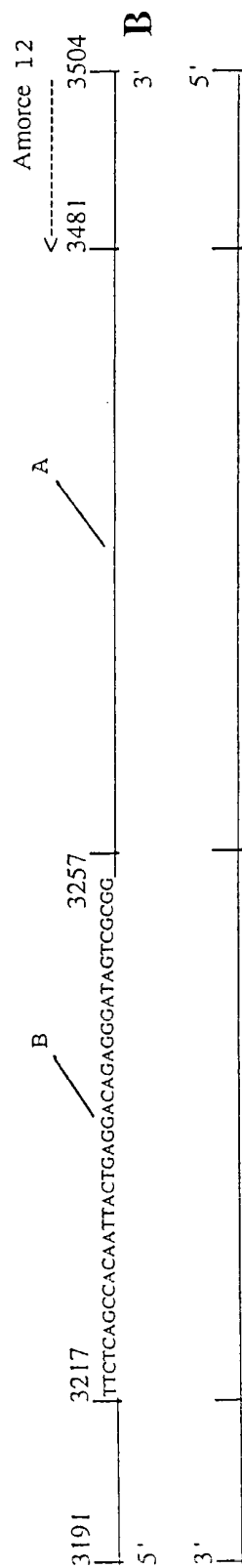


FIG. 3

4/12



Amorce 12



Amorce 12

FIG. 5

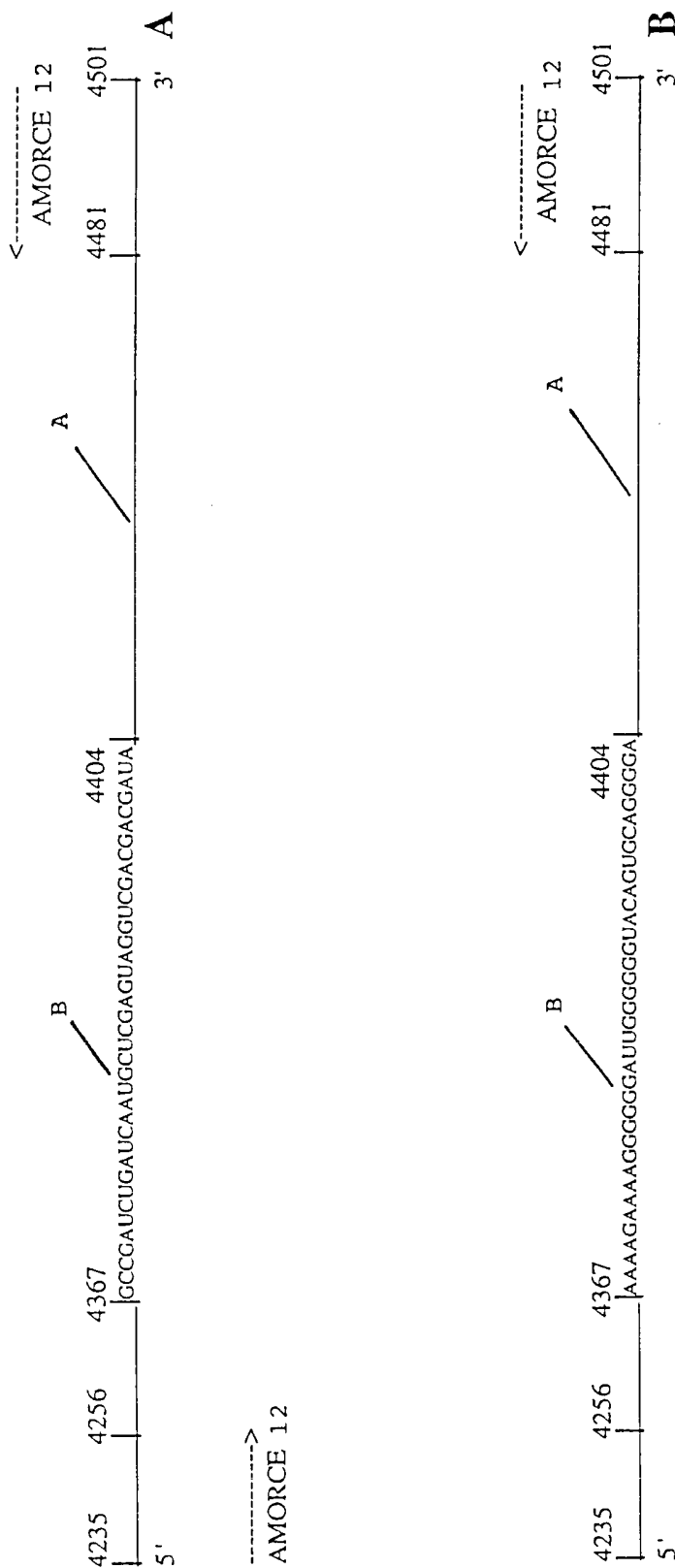


FIG. 6

6/12

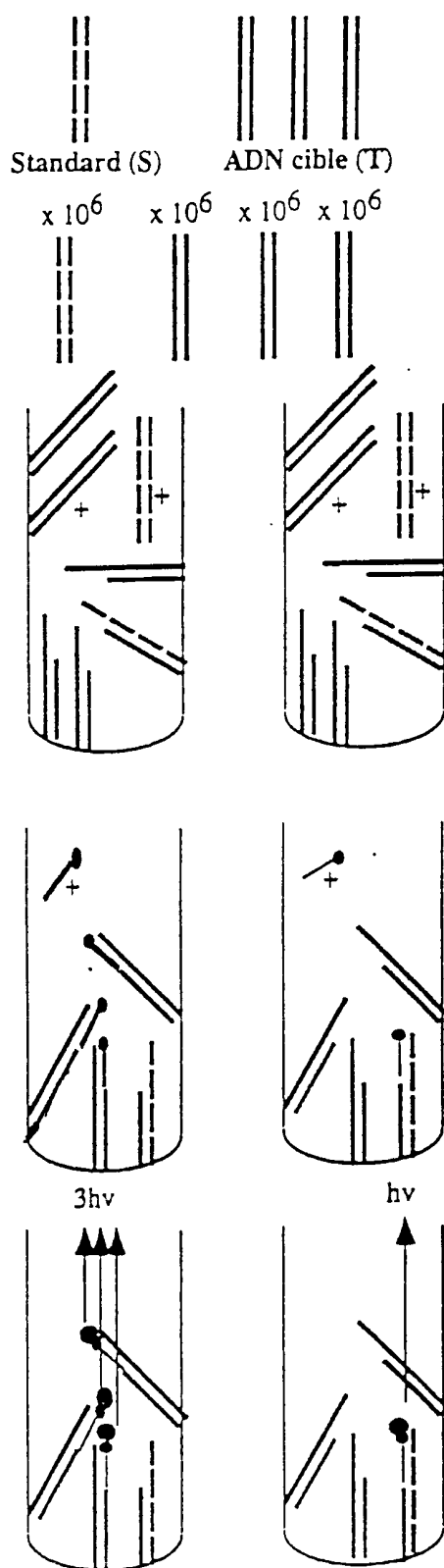
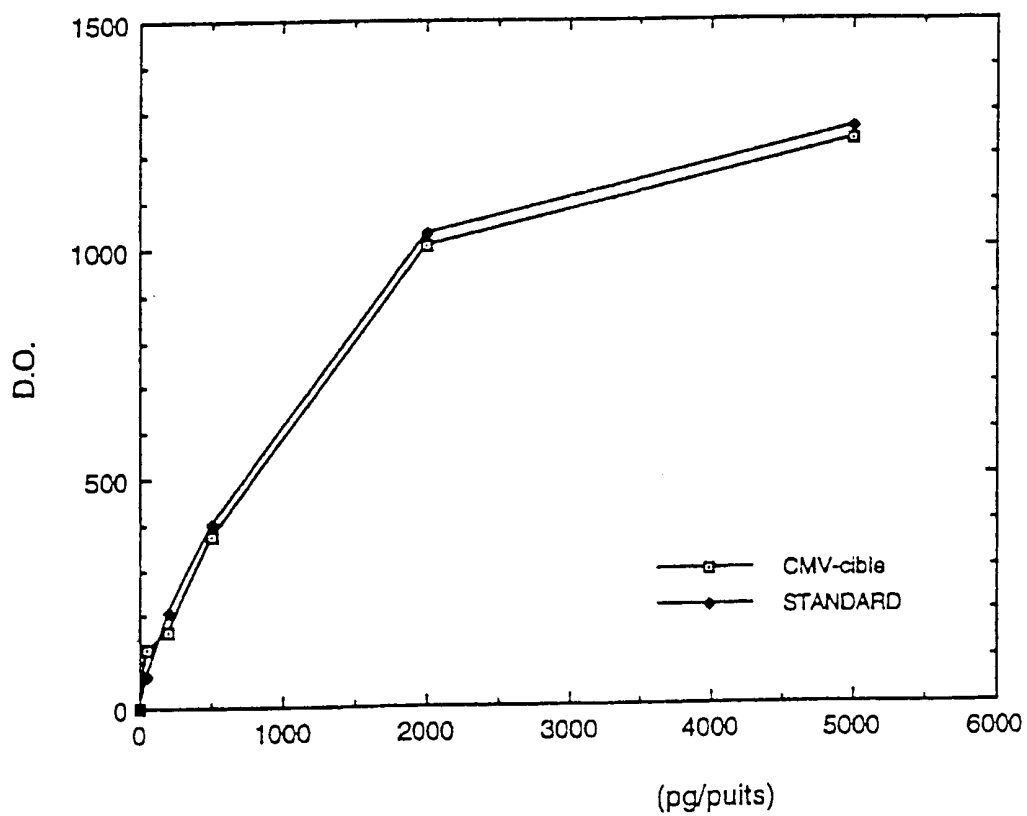


FIG. 7

7/12

FIG. 8



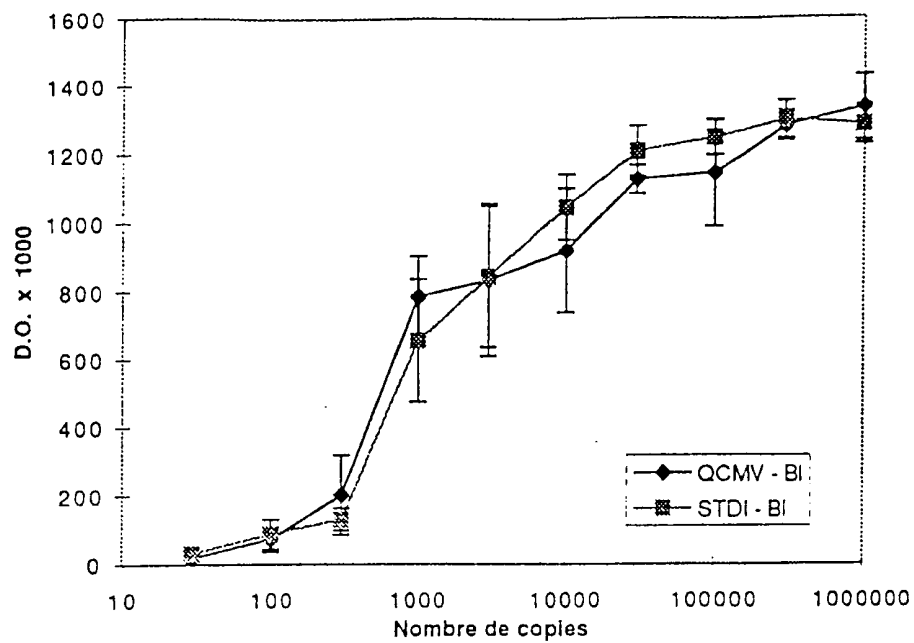


FIG. 9

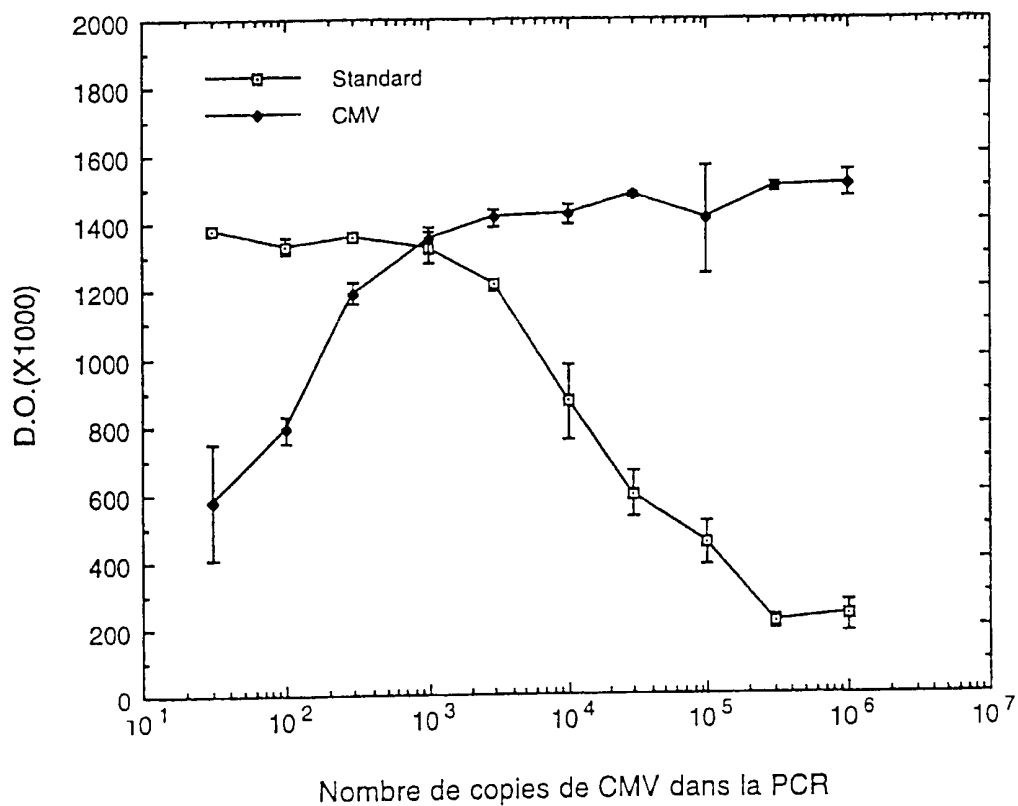
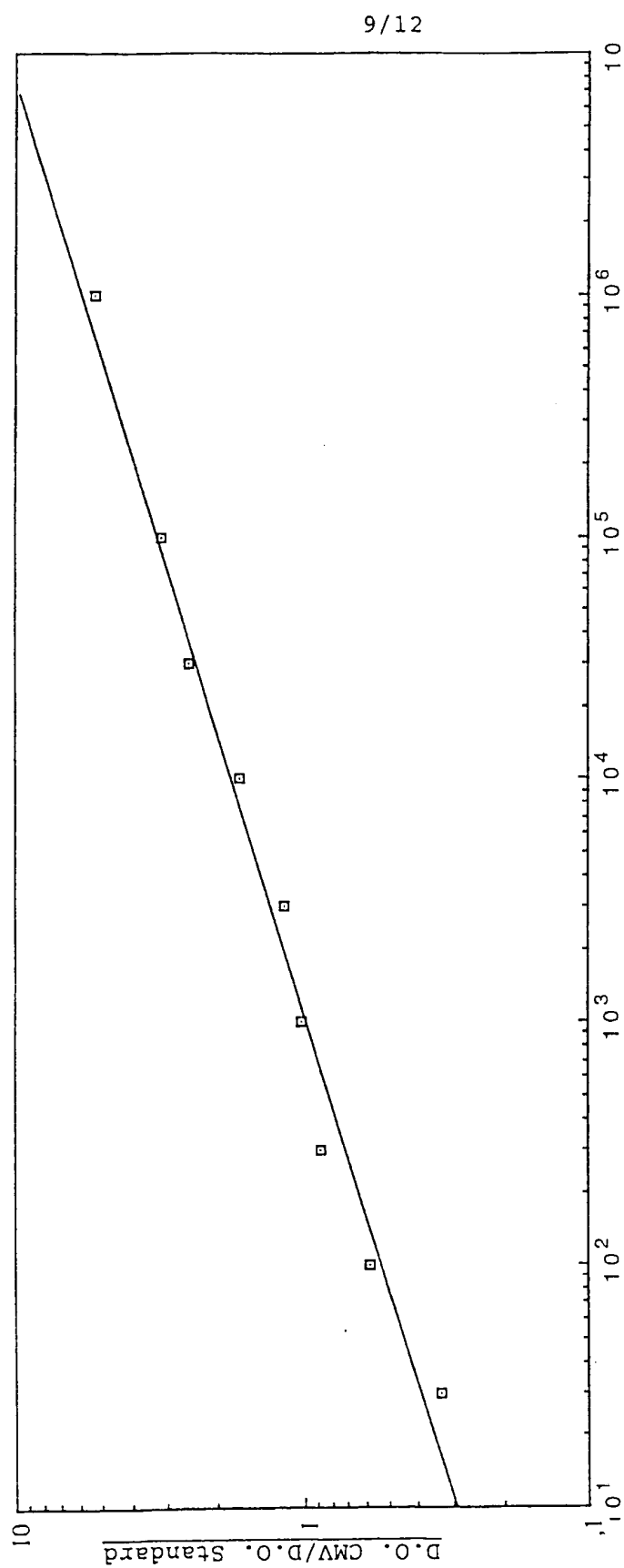


FIG. 10

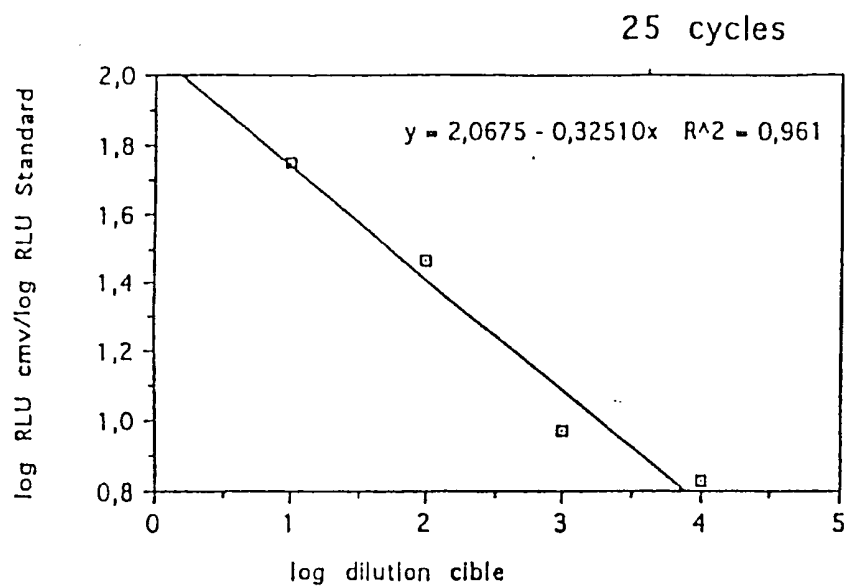
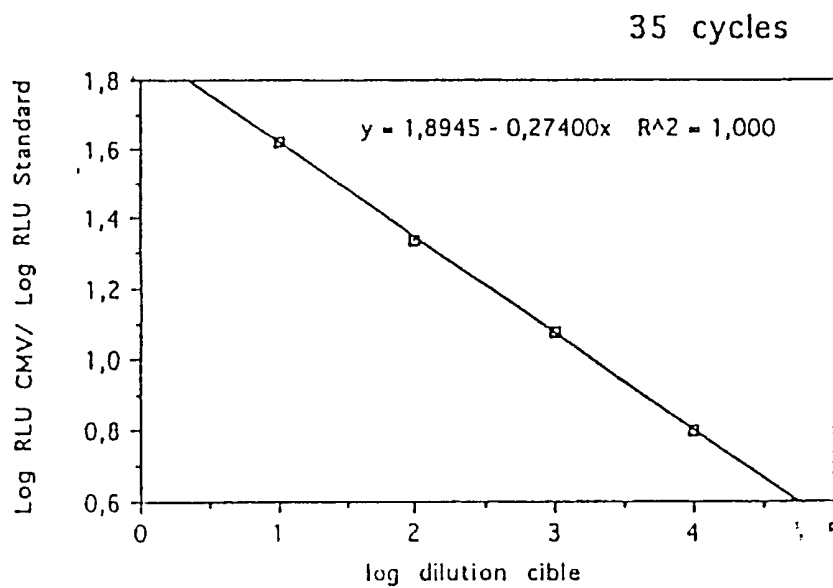


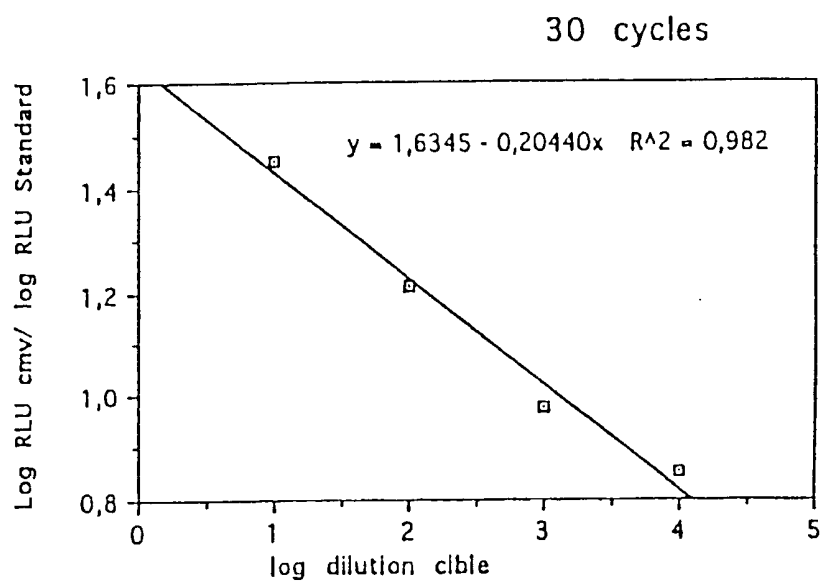
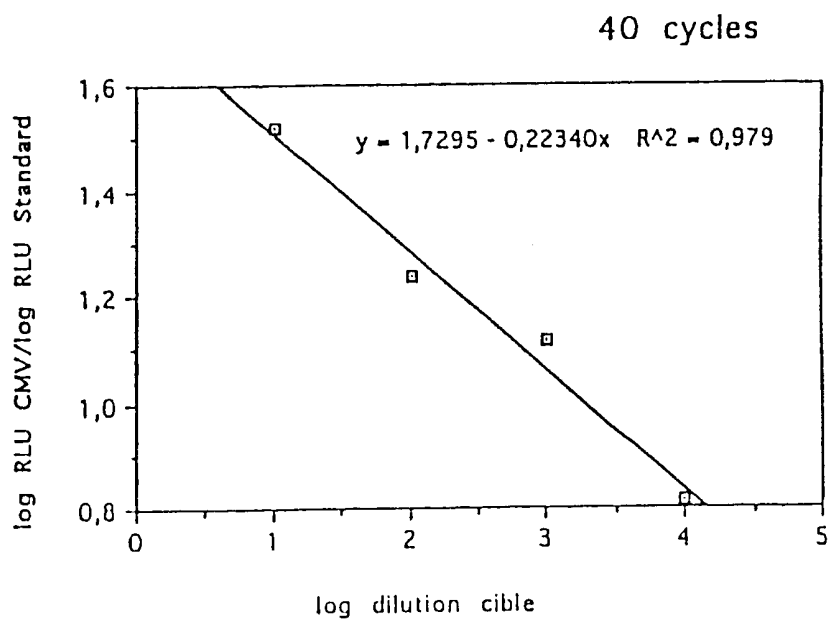
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Nombre de copies de CMV

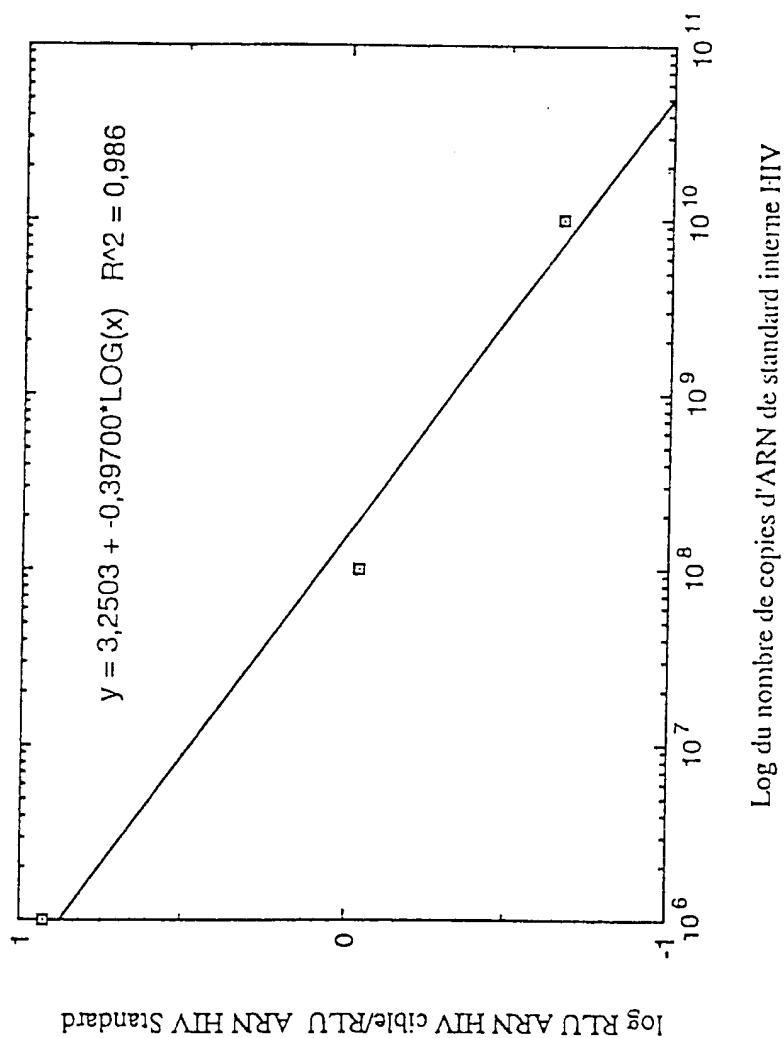
FIG. 11

10/12

FIG.12aFIG.12c

FIG.12bFIG.12d

12/12

FIG. 13